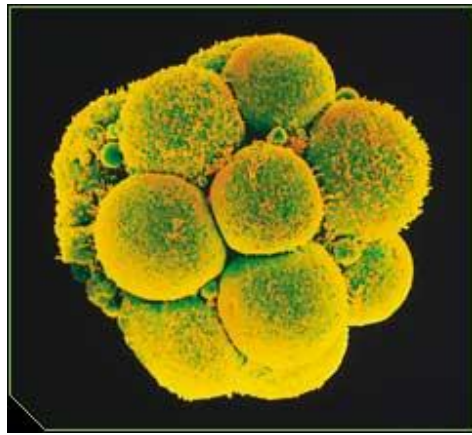


Репин В.С., Ржанинова А.А., Шаменков Д.А.

## **Эмбриональные стволовые клетки:**



**фундаментальная биология**

**и**

**медицина**

**Москва**

**2002**

**«Решетэкс»**

## Оглавление:

### ГЛАВА 1 Эмбриональные стволовые клетки: фундаментальные исследования

1. На пороге новой биологии и медицины 5
2. ЭСК: основные определения и концепция 8
3. Основные источники и способы выделения ЭСК (историческая справка) 26
4. Молекулярные основы тотипотентности генома ЭСК 46
5. Особенности фенотипа ЭСК 50
6. ЭСК – модель для изучения геномики раннего эмбриогенеза и 55

#### органогенеза

7. Направленная дифференцировка ЭСК и ППК *in vitro* 60
8. ЭСК в изучении функций Нох-генов 69
9. ЭСК - новый биоресурс медицины 71
10. ЭСК: законодательство и биоэтика 79
11. Мост между наукой и клиникой 83
12. Литература 86

### ГЛАВА 2 Стволовые клетки в эмбриогенезе мозга млекопитающих

1. Модели на стыке клеточной биологии и геномики 96
2. Нервная трубка - первоисточник провизорных стволовых клеток 98
3. Стволовое пространство обонятельного нейроэпителлия 105
4. Стволовое пространство эпендимы 107
5. Клональная дисперсия стволовых клеток мозга 109
6. Регионализация и сегментация нервной трубки 110
7. Первичный нейро - и глиогенез 119
8. Направленная миграция прогениторных клеток: взаимодействие с 121

#### радиальной глией

9. Нейрональные стволовые клетки *in vitro* 125
10. Методические трудности получения клонов НСК из ЭСК 133
11. Получение нейронов из ЭСК 135
12. Получение линий НСК 138
13. Трансплантация НСК/прогениторных клеток в развивающийся мозг 147

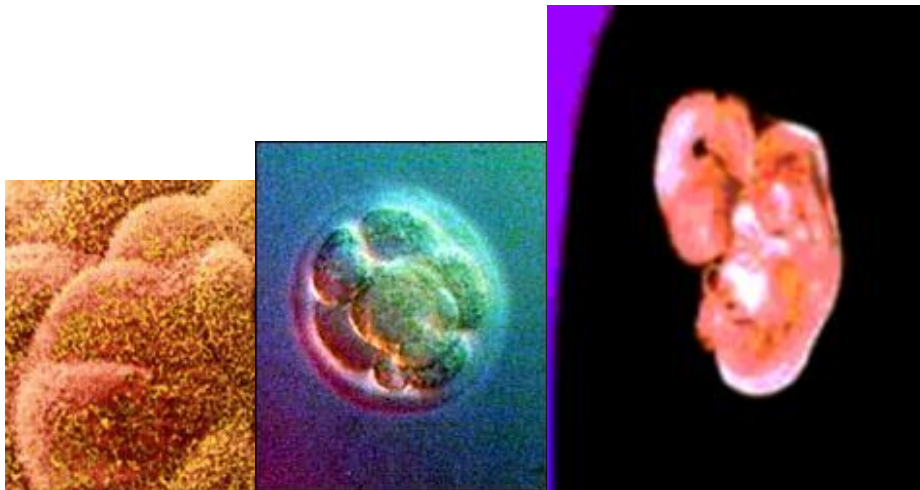
**эмбрионов**

<b>14. Трансдифференцировка НСК после трансплантации</b>	<b>148</b>
<b>15. Нейромезенхимальные стволовые клетки нервного гребня</b>	<b>149</b>
<b>16. Литература</b>	<b>162</b>
<b>Коллектив авторов</b>	<b>176</b>

## ГЛАВА ПЕРВАЯ

# Эмбриональные стволовые клетки: фундаментальные исследования

Природные силы внутри нас являются наилучшими целителями болезней  
Гиппократ



## 1. На пороге новой биологии и медицины

Поражающее разнообразие многоклеточных имеет весьма скромное начало в одной оплодотворенной яйцеклетке. Много поколений биологов и эмбриологов размышляло над загадкой, каким образом генетическая информация одной клетки макромасштабируется в сотни миллионов клеток нового зародыша.

Экспериментальный прогресс сдерживался тем, что яйцеклетки, зиготы и бластомеры не удавалось перевести в бессмертные линии, получив таким способом клеточный материал в количествах, достаточных для изучения спектров мРНК и белков (Weismann, 2000). Только эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) – пролиферирующие «дублиеры» зиготы – стали новым ресурсом клеток, стоящих у истоков развития. Наука сделала первый шаг к лабораторной ткани, повторяющей соматический эмбриогенез млекопитающих в обход гамет и оплодотворения. **Тотипотентность** – это свойство генома клеток макромасштабировать программы эмбриогенеза, в том числе воспроизводить любую из 250 специализированных клеток взрослого организма. Подобно зиготе и первым клеткам зародыша, ЭСК в простых условиях культуры воспроизводят «лабораторный» эмбриогенез в два этапа. Сначала микрограммовые количества «клеток без фенотипа» пассируют в миллиарды клеток. Затем незрелые постмитотические клетки с помощью набора химических инструкций *in vitro* видоизменяют в клетки мозга, сердечной, скелетной мышцы, печени и т.п. Получение соматических клеток из ЭСК идет в обход органогенеза и многих событий, происходящих при естественном развитии зародыша в матке. Как известно, специализированные клетки взрослого организма необратимо утрачивают способность к повторению эмбриогенеза. В культуре большинство специализированных клеток, изолированных из тканей, быстро дедифференцируются, теряя фенотип и профиль функций. Науке пока не известны способы получения стволовых клеток из дифференцированных клеток. ЭСК – это эмбриогенез без половых клеток и беременности.

ЭСК – незаменимая модель для функциональной постгеномики. Кардиомиоциты, миоциты, клетки крови и иммунной системы являются полными автоматами. Поведение ЭСК определяется взаимодействием внешних сигналов с эпигеномной

системой клеток, имеющих уникальную протеомику и огромное «меню» из предсинтезированных мРНК. На клетках ЭСК с максимально простым фенотипом легче анализировать главный алгоритм онтогенеза: как soft сигналы непрерывно изменяют hard- устройство клеток. В отличие от молекулярной генетики, изучавшей функции отдельных генов, постгеномика занимается протеомикой целостных белковых сетей (как soft-сети собирают клеточные устройства). Интегральные белковые сети - платформа целенаправленного поведения клеток в виде альтернативных ответов. Адекватный выбор сигналов и ответы ЭСК заставляют признать, что клетки имеют элементарный интеллект для распознавания, выбора сигналов, их селективной переработки. Селективный отбор сигналов транслируется далее в паттерны поведения клеток. Поведение клеток и его нарушение является конечной целью современной медицины. Этот уровень знаний дает новые инструменты для разгадок болезней клеток и старения.

Другая важная особенность генома ЭСК – спонтанная частота мутаций ниже в несколько раз, чем у соматических клеток. Внутрихромосомная рекомбинация и эндоредупликация отдельных сегментов хромосом полностью блокированы устройством хроматина. Генетическая нестабильность хромосом и анеуплоидия в пассажах характерны только для линий тератокарциномы и эмбриокарциномы (Servantes R.B., Stringer J.R., Tischfield J.A.,2002). Эта особенность организации хроматина делает маловероятными случайные перестройки хромосом, связанные с малигнизацией трансплантированных ЭСК-derivатов.

**Стволовая ниша** – стабильное микроокружение вокруг каждого клона ЭСК, создаваемое монослоем так называемых фидерных клеток. Трофобласт служит фидером для эмбриобласта у предимплантационных зародышей млекопитающих. Клетки хориоидного сплетения служат питательной, защитной и информационной средой для нейтральных стволовых клеток эндими развивающегося мозга. Эндотелиальные синусы, либо капиллярная сеть служат нишей для региональных стволовых клеток органов и тканей, в том числе для мезенхимальных стволовых клеток. По этой причине все ранние ЭСК зародыша выращивают в суспензии над монослоем фидерных стромальных клеток, которые обеспечивают незрелые плюрипотентные клетки всем необходимым для выживания и самообновления.

В настоящее время ЭСК нужны не только для расшифровки кодов пред-постимплантационного развития, но и лабораторного воспроизводства клеток органов в обход беременности. Получить миниорганы *in vitro* – более трудная задача, чем получить дифференцированные клетки тех же органов. Клетки -дублёры зиготы необходимы для биоэтически допустимых экспериментов. ЭСК не являются зародышем, не имеют статуса «новой жизни», поскольку получены в обход оплодотворения и беременности. Сохраняя ранг клеток, ЭСК являются чем-то большим: они серийно копируют органогенез. Они незаменимы для изучения стыков развития клетка/орган/ткань. Пока наука не имеет достаточной платформы, чтобы окончательно определить юридический/ биоэтический статус ранних зародышей, эмбрионов и плодов. Отсутствие законодательной базы относительно всех периодов жизни человека существенно влияет на принятие практических решений в области репродукционного и терапевтического клонирования. Биоэтические послышки многих высокоразвитых стран, утверждающих статус новой жизни и личности с момента зачатия и появления зиготы, идут вразрез с принятым законодательством, признающим права новой жизни лишь с момента рождения. Согласование этих вопросов на уровне государств и международных институтов (ООН, Совет Европы и т.п.) имеет первостепенное значение для свободного развития биологии и медицины. Как известно, права на новые исследования и знания могут быть ограничены, если человек или зародыш не становятся средством в руках других людей.

Биологи в современном обществе вынуждены отстаивать право на новые границы знаний и новые технологии. Развитие зиготы в зародыш воспроизводится в лаборатории. Многие представители религии настаивают, что создание/разрушение ранних зародышей в лаборатории недопустимо. В то же время в США и многих странах разрешено платное донорство яйцеклеток (1500-2000 долларов в США), которое открыло путь к внеполовому получению ранних зародышей. Один работающий банк спермиев и яйцеклеток в Норфолке (Канада) способен обеспечить работу всех биотехнологических компаний с искусственными бластоцистами для изолирования линий ЭСК. Бластоцисты сейчас можно получить путем переноса ядра соматической клетки заказчика в зрелую донорскую яйцеклетку, из которой предварительно был удален пронуклеус. Лабораторные банки тотипотентных клеток

уже создали техногенную эмбриологию и альтернативу половому процессу не с целью повторного воспроизводства копий уже живших людей, а с целью лечения миллионов пациентов на планете. Согласно прогнозу, в 2020-2030 годах примерно треть пациентов будет получать лечение в виде пересадок дериватов ЭСК. Не размышления, а единственно возможная помощь погибающему пациенту – это императив биоэтики у постели больного (особенно у фатально обреченных). Стремление помочь склоняют врача к лабораторному клонированию клеток пациента, как к последнему эффективному средству помощи. Аморальным в наше время становится не использовать ЭСК для создания банка резервных клеток каждого человека на случай заболевания. Наиболее гуманная биоэтика заставляет остальное общество видеть проблему прежде всего глазами и нуждами больных людей и их ближайших родственников. Каждый пациент имеет право на спасение и новые формы лечения. Наука и общество должны развивать медицину, дающую новый шанс на выживание или продление жизни существующим на земле поколениям. Новые реалии медицины сильно изменили вектор дискуссий вокруг ЭСК.

В XIV веке происходили ожесточенные теологические споры о возможности посмертных вскрытий с целью изучения внутренних органов и причин заболеваний. Всего несколько врачей того столетия посмели создать секционный зал. Без этих пионеров в следующем веке не было бы анатомического атласа и великих открытий Леонардо. Морфология стала первой королевой медицины XV века. В XXI веке на стыке клеточной биологии ЭСК с функциональной постгеномикой рождается новое будущее медицины XXI века. Неизбежно разгораются споры и дискуссии, а знания обрастают мифами и предубеждениями в обществе.

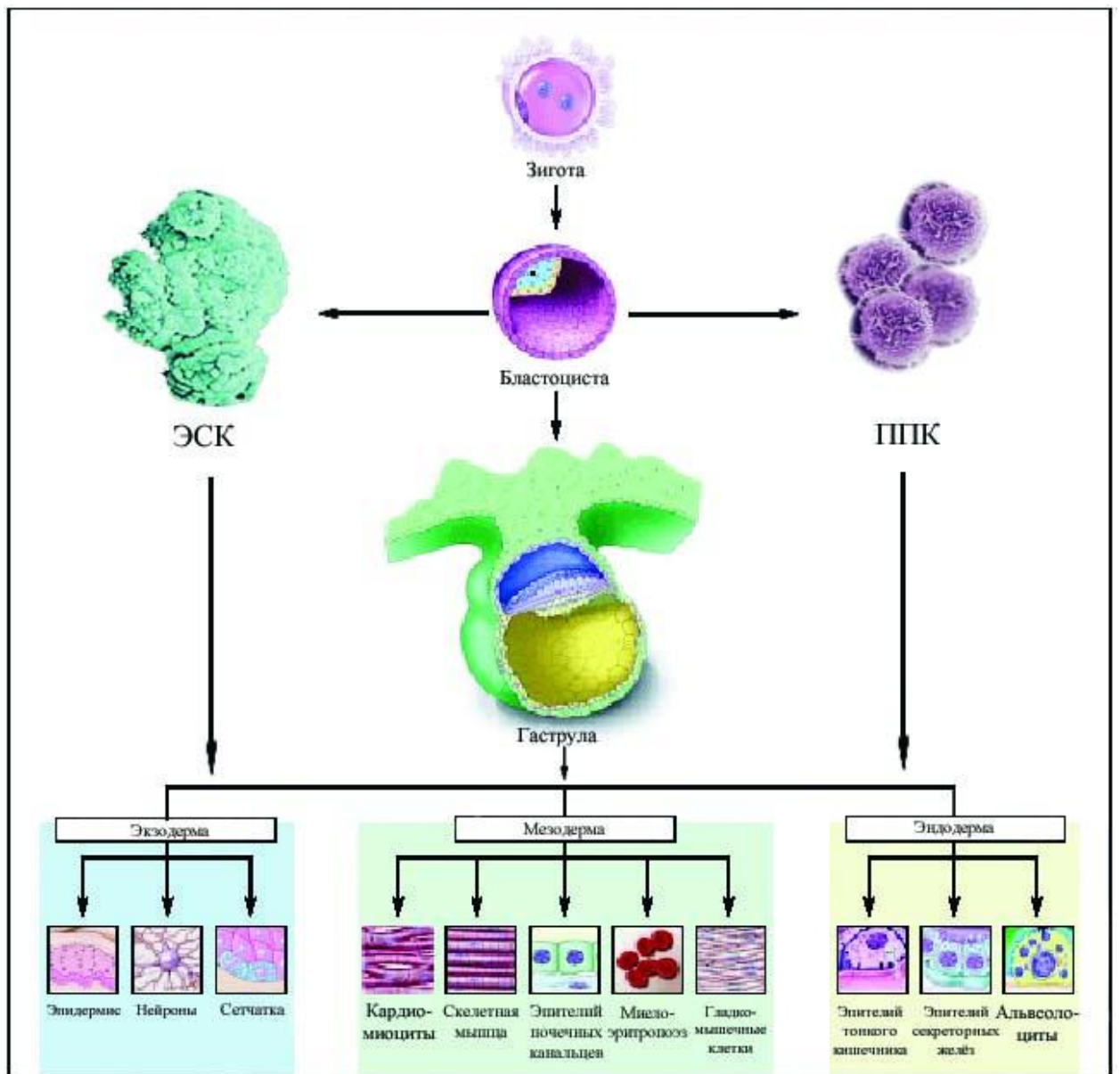
## **2. ЭСК: основные определения и концепция**

Все специализированные клетки взрослого организма происходят из стволовых клеток. Стволовые клетки – это «запасники», «НЗ» информации развития (эмбриогенеза). Эту информацию развития нельзя свести к генам, поскольку каждый этап развития не запрограммирован автоматически, а связан с утилизацией сигналов и эпигенетической информации. ЭСК – это программа и процессор информации



одновременно. Программы развития сильно меняются в зависимости от окружающей среды. Своевременное обновление репертура здоровых клеток является незаменимым условием здоровья и долголетия многоклеточного организма. Все органы взрослого человека и млекопитающих сохраняют «реликты» зародышевой ткани в виде микровкраплений стволовых клеток. Стволовые клетки – орган срочной макрорепарации при массивном повреждении ткани. Одновременно стволовые клетки – это аппарат обновления, смены устаревших «больных» клеток, в том числе для защиты от преждевременного старения. ЭСК позволяют избавиться от больных клеток не с помощью лекарств, а путем своевременной смены клеток.

Главная идея молекулярной медицины – найти лекарство для излечения больных клеток - выглядит привлекательной, но непрактичной. Если в больном органе заблокировано самообновление клеток, то накапливается множество аномальных клеток разного фенотипа. В этом случае понадобилось бы миллион «волшебных пуль» для нормализации миллиона разных больных клеток. Часто функциональная паренхима органов замещается производными мезенхимы (фиброз, атеросклеротические бляшки, глиоз и т.д.). Только факторы своевременной регенерации паренхимы способны защитить органы от повсеместного разрастания соединительной ткани.



**Рис 1-1** Лабораторные пути получения дериватов тканей человека из тотипотентных ЭСК и ИПК

В геноме соматических клеток отсутствуют «программы» лечения. Геномика аномальных клеток использует несколько вариантов апоптоза для аутоэлиминации ненормальных клеток. С другой стороны пересадки СК ускоряют самообновление клеток в органах, в том числе элиминацию патологически измененных клеток.

Для исследователей ЭСК- это «шпаргалка» для расшифровки работы генома (особенно в период раннего эмбриогенеза и органогенеза). Необходимо напомнить, что изучение эмбриогенеза человека ограничено по биоэтическим соображениям. Постимплантационный эмбриогенез млекопитающих мышей, крыс, других лабораторных млекопитающих имеет существенные отличия. Во многих ситуациях ЭСК остаются единственной экспериментальной возможностью для моделирования событий, происходящих в зародыше человека после имплантации. Таким образом, ЭСК человека и млекопитающих – незаменимый путь для изучения аномалий постимплантационного развития зародышей. Самые ранние события кардиогенеза, миогенеза, нейрогенеза с дешифровкой soft-программ самосборки клеток в органы доступны пока лишь в культуре ЭСК (Kehat I., Kenyagin-Karsenti D., Snir M. Et al.,2001).

Для ЭСК характерно два варианта запрограммированного поведения в культуре. 1) незрелые ЭСК длительно размножаются в присутствии фидерного слоя клеток и ростовых факторов. 2) после наработки массы недифференцированных клеток, размножение клеток останавливают, изменяя условия культивирования. Начинается дифференцировка клеток (желательно в один тип специализированных клеток) . (Рис 1-1)

ЭСК назвали "лабораторными лошадками" регенерации (Petit-Zeman, 2001), потому что регенерация органов практически невозможна за счет резерва собственных дифференцированных клеток. ЭСК «банкируются» *in situ* и повторяют фрагменты эмбриогенеза в тканях взрослого организма. Некоторые линии ЭСК человека удавалось пассировать без изменения фенотипа более 2 лет. Такие культуры прошли 300-450 циклов удвоения клеток без возникновения анеуплоидии или опухолей. При устранении фидера, ростовых факторов, а также после добавления сигналов начиналась медленная многоэтапная дифференцировка ЭСК в популяции дефинитивных, необратимо специализированных клеток. Интересно, что дифференцировка ЭСК в нейроны, кардиомиоциты идет за 10-15 дней, тогда как

аналогичные процессы линейного созревания клеток в эмбрионе идут 5-7 нед (Kawasaki H., Suemori H., Mizuseki K. et al., 2002). В последнее время стали использовать сигналы фидерного слоя клеток для ускоренной дифференцировки клеток в культуре.

В зародыше и взрослом организме потенции генома стволовых клеток существенно варьируют по "ассортименту" фенотипа специализированных клеток. Более ранние, **тотипотентные** ЭСК дифференцируются в любую из 250 линий специализированных клеток органов. Необходимо подчеркнуть, что ЭСК *in vitro* не продуцируют клеток трофобласта, плаценты, т.е. потенции генома ЭСК меньше зиготы.. Соответственно биологический статус ЭСК меньше статуса раннего зародыша. **Плюрипотентные** ЭСК дают более ограниченный спектр фенотипов. Например, мезенхимальные стволовые клетки (МСК), локализованные в опорно-сосудистом каркасе органов, дифференцируются в культуре только в клетки хряща, кости, кардиомиоциты и миоциты. **Монопотентные** стволовые клетки (мышц, жировой ткани, периферических нервов) созревают до одного преобладающего фенотипа клеток. Стволовые региональные клетки взрослого организма наделены **мультипотентностью**- пластичной плюрипотентностью, которая сильно варьирует в контексте органа-реципиента. Так, пересадки гематогенных стволовых клеток в мозг, сердечную или скелетную мышцу приводили к образованию ткане-специфичных ростков донорской ткани в органах реципиента. Однократное переливание 0,5 л донорской женской крови мужчине-реципиенту химеризует женскими клетками все паренхиматозные органы (Korbling M., Katz R.L., Khanna A. et al., 2002). Большое внимание уделяется сейчас мультипотентным МСК взрослых органов, поскольку эти клетки хорошо мигрируют и многократно химеризуют ткани. В свою очередь, пересадки нейрональных стволовых клеток в печень, мышцу или иммунную систему сопровождались тканеспецифичной перестройкой фенотипа донорских клеток. Хорошо доказано, что сигналы микроокружения играют решающую роль в судьбе трансплантированных ЭСК/МСК *in situ*. Существенно, что ЭСК/МСК при дифференцировке в культуре давали лишь "природные" линии дифференцированных клеток, которые встречались в организме взрослого животного и человека. Никаких новых типов клеток или неизвестных линий дифференцированных клеток из ЭСК не

возникало *in vitro* (O'Shea, 1999). Наблюдения подтверждены другими многочисленными работами, что снижает риск осложнений и повышает безопасность клеточной терапии дериватами стволовых клеток.

Тотипотентность ЭСК *in situ* проверяется несколькими способами. При трансплантации в морулу или бластоцисту донорские ЭСК встраиваются сначала в эпибласт и провизорные органы. Далее они мигрируют практически во все органы плода. После рождения ростки донорской ткани, дериватов ЭСК, выявляются и прогрессируют в костном мозге, кишечнике, коже, костях, печени, головном мозге, иммунной системе. Показано, что миграция ЭСК в ранних зародышах велика и практически не лимитирована до стадии сегментации. Пересадки ЭСК использовали для подсчета числа founder cells в закладках органов мыши, крысы, приматов. Усредненная эффективность химеризации линейно зависела от числа донорских клеток, заселивших эпибласт – главный орган образования founder cells. Идентичные пересадки МСК в морулу/бластоцисту овец и мышей приводили к накоплению и размножению донорских клеток только в костной, жировой, гематогенной, иммунной системе. МСК лишь ограничено накапливались в строме печени, легких, почек и мозга (Liechy KW, MacKenzie TC, Shaaban Af, 2000). Несовпадающее распределение МСК и ЭСК по тканям развивающихся эмбрионов является их важным отличительным маркером. Имплантация ЭСК и МСК в ранние зародыши никогда не заканчивалась малигнизацией. Показано, что ЭСК мыши (приматов) встраиваются в морулу, бластоцисту, эпибласт зародыша крысы. Закономерности встраивания МСК в эпибласт не изучены. Только часть территории эпибласта доступна для встраивания МСК. Поразительно, как клетки разных видов без помех взаимодействуют на уровне рецепторов, сигналов, программ, темпов развития химер. Химеры реализуют один трехмерный план строения без морфоаномалий (тератогенеза). У клеточных химер всегда доминирует морфотип беременной самки (O'Shea, 1999). Для скрининга тотипотентности *in situ* ЭСК пересаживали в разные органы иммунодефицитных мышей, либо изогенных животных (для исключения иммунного отторжения). Если пересадки предимплантационных зародышей в мозг всегда заканчивались резорбцией, то пересадки ЭСК в виде агрегатов (эмбриональных телец) давали стабильные ростки дифференцированной нервной ткани. На стадии эмбриональных телец

постмитотические клетки начинали дифференцироваться *in vitro*, *необратимо теряя способность генерировать опухоли*. Пролиферирующие незрелые ЭСК при пересадке в брюшную полость, под кожу или под капсулу почки давали опухоли (эмбриотератомы) у взрослых особей. Чем медленнее росла опухоль, тем больше была доля спонтанно дифференцированных клеток (Robertson, 1987; Watt, 2000). Эмбриотератомы содержали эпителий тонкого кишечника, миоциты, нейроны, кардиомиоциты, гладкомышечные клетки, фрагменты волос, кожи, хряща и кости. .

Поэтому линии ЭСК тщательно проверяются на канцерогенность в случае пересадок животным. Пересадки ЭСК в мозг никогда не сопровождались возникновением кардиомиоцитов, миоцитов или кожи. В свою очередь трансплантаты ЭСК в сердце не давали нейронов или секреторных клеток кишечника. Локальная дифференцировка ЭСК *in situ*, как правило, контролировалась "сигналами" микроокружения. Тотипотентность ЭСК человека проверяли по понятным причинам лишь на животных. Ограниченные клинические наблюдения также подтвердили отсутствие аномалий дифференцировки стволовых клеток в трансплантате.

Рост ЭСК в культуре идет клонами. В отличие от обычного экспоненциального размножения клеток в культуре, клон не растет, а самообновляется. Только в клоне сохраняется микроокружение, позволяющее стволовым клеткам удерживать необычно высокую генетическую потенцию. Эта особая геномика клеток сохраняется и воспроизводится только в плотной сфере. Каждая культура ЭСК имеет варьирующую долю клеток в суспензионных агрегатах (сферах). Одиночные клетки, покидая клон, неизбежно дифференцируются. Лишь агрегаты составляют суммарное пространство плюрипотентных клеток, остальные клетки специализируются под влиянием микроокружения. Большинство новых фенотипов возникает по периферии клонов. В каждом клоне клетки одновременно дифференцируются в разные фенотипы, подтверждая важность микроокружения (мозаика инструкций-сигналов может быть весьма разнообразной даже внутри одного клона).

Известно, что в первичной культуре эмбриобласта (эпибласта) обязательно сохраняют первичные агрегаты клеток при получении линий ЭСК (Talbot N.C., Carrett W.M., 2001) Одноклеточные суспензии эпибласта/эмбриобласта зародышей человека и обезьяны практически не выживали в первичной культуре. Внешние слои клона более

активно пролиферировали в среде с ростовыми факторами (LIF, SCF, IL-6, bFGF, EGF, TGF- $\alpha$ ). Состав и оптимальные концентрации факторов пролиферации подбираются эмпирически в каждой культуре. Более продвинутые клетки по периферии сфер гибли в селективной среде, предназначенной для выживания наименее зрелых популяций. Когда клеточные агрегаты достигали размера 30-50 клеток, наступало равновесие между пролиферацией и апоптозом. Каждый клон – это микромодуль самообновления клеток в постоянном миниобъеме. Репертуар прогениторных клеток постоянно меняется без изменения самого стволового пространства. Провизорные клоны сменяются дефинитивными клетками за счет множественных циклов самообновления клеток. Спонтанную дифференцировку и гибель клеток предотвращали повторным диспергированием агрегатов. Клоногенность – это способность культуры генерировать разную численность клон-иницирующих клеток на мл. Пока клоногенность существующих линий находилась на уровне 1-2 % (Pera M.F., 2001). Сигналы, запускающие инициацию клонов, практически не изучены. Выявлены варианты ЭСК, в которых исходно экспрессированы разные наборы генов, отвечающих за два главных качества клона: 1) плюрипотентность генома 2) самообновление прогениторных клеток (Morrison S.J., Shah N.M., Anderson D.J., 1997).

Даже малые концентрации сыворотки полностью блокировали клон-иницирующие клетки. В бессывороточной среде с помощью комбинации митогенов (bFGF, LIF) в лучшем случае удавалось поднять инициацию клонов в 3,5 раза. В каждом клоне присутствовали две популяции незрелых клеток с разным механизмом пролиферации. В ядре клона пролиферировали самообновляющиеся клетки с минимальным фенотипом и максимальной плюрипотентностью. На периферии клона некоммитированные прогениторные слои вступали в цикл созревания, который сопровождался усложнением белкового фенотипа и уменьшением генетической потентности клеток. Если в зародыше млекопитающих на стадии органогенеза половина клеток приходилась на провизорные некоммитированные клоны стволовых клеток, то в фетальной печени одна стволовая гематогенная клетка уже приходилась на 100000 гематогенных клеток. В кроветворной ткани взрослого человека насчитывается одна гематогенная стволовая клетка на 2-10 миллионов коммитированных клеток. Даже в короткоживущих организмах как дрозофила,

многие клоны стволовых клеток в яичнике имеют среднюю продолжительность жизни около 20-25 дней (Morrison S., Shah N.M., Anderson D., 1997). Пока точно количественно не подсчитано, какое количество ЭСК выживает в разных органах человека и мыши после рождения.

Недавно получены линии мышинных ЭСК с эффективностью образования клонов порядка 20%. Их источником стали культуры ЭСК, меченые цветными белками, поставленными под промотор ранних генов (Rex-1), экспрессированных в ЭСК. Все светящиеся клетки отбирали на сортере, а линии получали из высокоочищенного сырья, поскольку продвинутые клетки всегда блокировали выживаемость и пролиферацию клон-иницирующих клеток. Эмпирически из очищенной популяции клеток удавалось получить культуры с 10-20% клоногенностью (Pera M.F., 2001). Существенно, что часть таких клонов стабильно сохраняла высокий индекс клеточной пролиферации.

Более продвинутые клетки не только конкурировали со стволовыми незрелыми клетками за лимитирующие факторы питания, но и секретировали в среду факторы, блокирующие плюрипотентность генома незрелых клеток. Культивирование стволовых клеток всегда начиналось с селективной среды, где 99% продвинутых клеток погибали, а малая часть выживших стволовых клеток начинала пролиферировать.



## **ЭСК – лабораторные двойники зиготы**

### **Геном:**

тотипотентность  
не автоматы

### **Минимальный фенотип**

**Рост клонами без  
аномалий ДНК и  
кариотипа**

### **Тотипотентность клона**

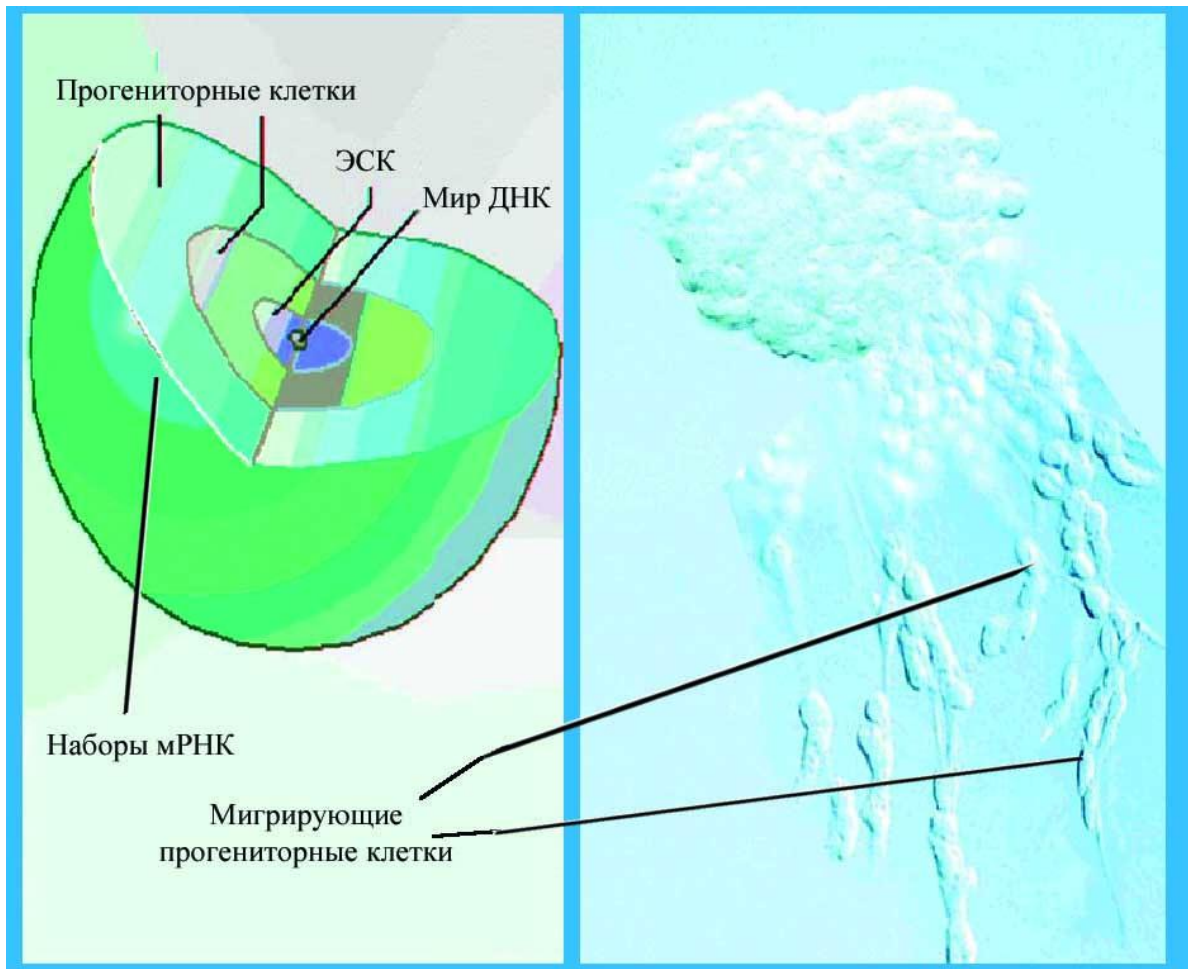


**Рис 1-2. Основные характеристики ЭСК**

- **происхождение:** клетки эпибласта, половые прогениторные клетки, перенос ядра донорской клетки в цитоплазму ооцита
- **стабильная пролиферация без генетической модификации и онко-иммортализации**
- **клоногенный рост с самообновлением клеток**
- **плюрипотентность генома:** источник всех фетальных и взрослых клеток кроме трофобласта и провизорных транзиторных клеток (нервный гребень и т.п.)
- **рецептор – и GP-130- опосредованная супрессия дифференцировки плюрипотентных клеток**
- **Ost4 –опосредованное ингибирование транскрипции генома**
- **Отсутствие G1 –фазы митоза**
- **Отсутствие X - инактивации в XX - клетках**
- **Колонизация всего зародыша, включая половой зачаток**

- **Видовые и тканевые различия в чувствительности ЭСК к митогенам и индукторам клеточной дифференцировки**

Периферия клона использует "навигационную" информацию для направленного перемещения клеток. Пролиферация и миграция клеток отвечают за экспансию клонов и рост зародыша. Клон - это повторяющийся модуль переноса и реализации software онтогенеза, в котором тотипотентность генома кодируется сначала наборами мРНК, а позднее - новым репертуаром белков.



**Рис 1-3а Схематическое устройство клона ЭСК**

**Рис 1-3б Клон ЭСК с шлейфом мигрирующих клеток (фазово-контрастная микроскопия)**

В начале развития клон содержит прогениторные слои с одним набором мРНК. В конце развития тот же клон поставляет другие клетки с другим профилем мРНК. Простые клеточные деления вне клона потребовали бы огромного объема для реализации программ развития. Морула и бластоциста являются уникальной стволовой нишей, в которой пересаженные плюрипотентные клетки репрограммируются до потенции первых бластомеров. Предполагают, что это может быть связано с наличием уникальных белков репрограммирования – Id1, Id2, Id3 и Id4 (inhibitor of differentiation). Плюрипотентность эмбриобласта и тканей постимплантационных зародышей обеспечивается разными комбинациями ID (Yen J., Manova K., Venezia R., 1997). Трофобласт, строма фидера для выращивания ЭСК, включая клетки Сертоли, также секретирует в среду наборы ID (Chaudhary J., Johnson J., Kim J. et al., 2001). Известно, гематогенные колонии из костного мозга взрослого человека синтезируют бета-цепь взрослого гемоглобина. Если взрослую региональную гематогенную клетку человека пересадить в бластоцисту мыши, то в химерном зародыше потомство донорских клеток начинают синтезировать сперва зародышевый, затем фетальный, позднее взрослый гемоглобин. Фенотип клеток четко идентифицируется разными генами варибельной цепи гемоглобина. Поэтому пересадки стволовых гематогенных клеток взрослых пациентов в бластоцисту мыши (кролика) пытаются использовать для создания гуманизированных бластоцист мыши. Бластоцисты животных уже используют для репрограммирования генома и возвращения тотипотентности региональным стволовым клеткам человека. Бластоциста является природным миниинкубатором для репрограммирования ДНК более продвинутых клеток к нулевой точке развития. Аналогичным образом из гуманизированных химер в постимплантационном периоде можно рекапитулировать клетки первичной эктодермы, желточного мешка, сомитов и нервного гребня уже существовавшего человека.

Все сомиты зародыша мыши возникают примерно из 100-150 стволовых клеток эпибласта, занимающих строго фиксированную территорию (Dale K.J., Pourquie O., 2000). В клонах-предшественниках сомитов работают два гена-таймера (c-hairy1, lunatic fringe), которые обеспечивают ритмические, периодические волны пролиферации прогениторных клеток. Плюрипотентность пролиферирующих

прогениторных клеток контролируется с помощью продукта гена *Hes*, а пролиферация клеток - за счет спаренного рецептора *Delta-Notch*. Далее в каждом сомите разворачивается индивидуальный профиль экспрессии генов во времени.

Сравнительный анализ показал, что линии ЭСК человека имеют существенные отличия от ЭСК животных по набору параметров: выживаемость и чувствительность к разным условиям культивирования, зависимость от митогенов и факторов апоптоза, факторов цитодифференцировки и сигналов, контролирующих функциональное созревание и поведение клеток *in vitro* (Carpenter M.K., Inokuma M.S., Denham J. et al., 2001). Поэтому данные, получаемые на ЭСК мышей, с большими оговорками экстраполируются на человека. Исследования генома плюрипотентных клеток животных, включая эффект лекарств, имеют сигнальное, но не решающее значение, особенно в областях прикладной медицины. Здесь нужны прямые эксперименты на ЭСК человека.

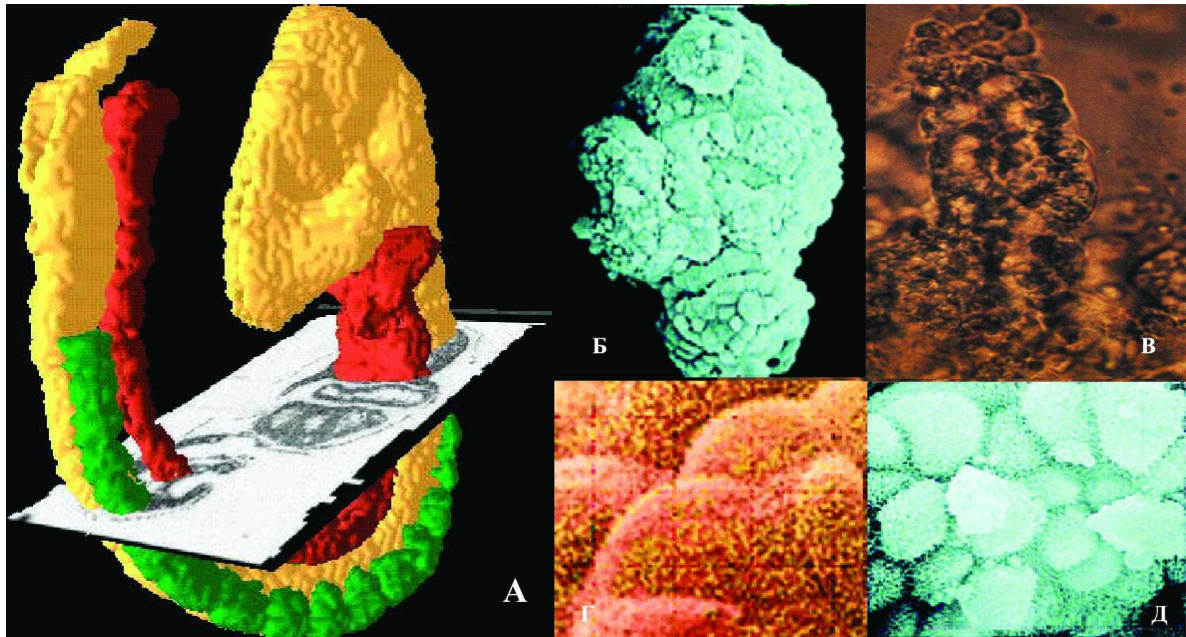
Существенно, что **тотипотентность клона больше тотипотентности отдельных ЭСК** (рис 1-2). Клон – это ансамбль тотипотентных ЭСК. Каждая ЭСК редактирует наборы мРНК по своим программам. Очевидно, что гетерогенный клон перерабатывает больше информации на языке мРНК, чем одна тотипотентная клетка... Основная часть мезенхимы (первоисточник соединительнотканного и сосудистого каркаса паренхиматозных органов) происходит из мезодермы. Ранее предполагали, что клоны паренхимы (функциональных повторяющихся единиц органа) и мезенхимы (опорная строма + коммуникации) возникают в зародыше независимо. Лишь недавно установлено, что практически все клоны провизорных некоммутированных клеток на стадии органогенеза представлены мозаикой тотипотентных провизорных клеток, имеющих ранние фенотипические маркеры трех зародышевых листков и мезенхимы. Любой такой клон представляет фрагмент тотипотентной ткани - той первичной "строительной глины", из которой "лепится" ранний зародыш. В лаборатории Герхарта налажено лабораторное получение экто-, мезо- и эндодермы из агрегатов (эмбрионидных телец) ЭСК, постоянно содержащих вкрапления мезенхимальных стволовых клеток. В зародыше мыши сначала количественно превалируют клоны провизорной экстраэмбриональной ткани. Как в культуре ЭСК, так и в ранних зародышах, появление экстраэмбриональной эндодермы маркируется экспрессией

Нох-12 (Нох-4-7 гена) (Labosky P.A., Weir M.P., Grabel L.B., 1993). Только к середине беременности (10-11-й день) доля плюрипотентной ткани самого зародыша резко увеличивалась (Beddington R., Robertson E.J., 1999). До сих пор неизвестно, можно ли тотипотентность ЭСК довести до потенции генома зиготы. Если ЭСК пересадить в бластоцисту с удаленным эмбриобластом, развитие зародыша необратимо останавливается. В то же время пересадки ЭСК в 2-36-клеточный зародыш мыши ведут к внешне нормальному развитию химеры. Следовательно, потенциал ЭСК стыкуется с ранними бластомерами, но не стыкуется с клетками эмбриобласта/эпибласта. Это подтверждается невозможностью трансформации ЭСК в клетки эпибласта/эмбриобласта *in vitro*. (Smith A.G., 2001). Некоторые исследователи до сих пор считают иммортализованные линии ЭСК лабораторным артефактом – экспериментальным “трюком” обновления клонов, возникшим под влиянием эпигенетических сигналов. Поведение плюрипотентных клеток в культуре и зародыше существенно отличается. Ясно, что генетические потенции исходных стволовых зародышевых клеток больше, чем линий ЭСК. Даже в культуре под влиянием факторов микроокружения ЭСК способны генерировать множество фенотипов клеток. Гораздо хуже поняты возможности ЭСК в плане повторения событий эмбриогенеза *in vitro*.

Пересадки ЭСК в морулу, митозы в которой были остановлены цитокалазином, приводили к рождению зародышей, органы которых были собраны исключительно из донорских клеток. Неразвивающаяся морула играла важную роль пространственной матрицы, направляющей 3-D-взаимодействие ЭСК. Новый зародыш из донорских ЭСК развивается и на базе тетраплоидных бластомеров, которые прямо не участвуют в развитии.

Интенсивная миграция и колонизация донорскими ЭСК ранних зародышей не является каким-то эксклюзивным феноменом. Стволовые клетки взрослых тканей также имеют тенденцию к миграции и обмену. Пересадки сердца, печени, почек сыграли важную роль в изучении судьбы донорских стволовых клеток в организме реципиента. Оказалось, что после пересадки женских донорских органов мигрирующие стволовые клетки XX генотипа выявлялись практически во всех органах реципиента мужского пола через 10-12 месяцев после трансплантации. В

количественном отношении посттрансплантационная химеризация сопоставима с химеризацией беременной матери клетками развивающегося эмбриона. В ряде случаев такое смешение гено/фенотипов сопровождалось частичной иммунотолерантностью к антигенам донорских клеток (Uuaini F., Urbanek K., Beltrami A. et al.,2002)



**Рис 1-4 Клональная организация тотипотентной ткани зародыша на стадии органогенеза**

**А- компьютерная 3D-модель зародыша,                    В- клон провизорных  
Б- клон провизорных некоммутированных                    некоммутированных клеток  
клеток под сканирующим электронным                    Г,Д- межклеточные взаимодействия  
микроскопом                    в клоне**

Почему клон провизорных мультипотентных ЭСК следует считать центральным звеном органогенеза? Клон передает информацию наборами мРНК. На периферии клона часть мРНК транслируется в изменение фенотипа клеток. На краю сферы появляются клетки с цитоскелетом, аппаратом локомоции для реализации "навигационной" информации. Подавляющее число клеток на периферии клонов

направленно мигрируют, колонизируя новые пространства зародыше. Например, все структуры и центры головного мозга зародыша создаются за счет пришлых прогениторных клеток. Серийное размножение провизорных клонов зародыша необходимо для подготовки *software* органогенеза, которую невозможно уместить в нескольких клетках. В отличие от условий *in vitro*, в целом зародыше экспансия клонов контролируется генами сегментации и органогенеза (Нох-генами). Комбинации Нох-генов в клетках ретранслируются в трехмерную карту зародыша (включая численность клеток в будущих органах). Карта провизорных органов зародыша создается за счет прямых взаимодействий клонов трех зародышевых листков и мезенхимы. Организованный рост мезенхимы определяет организованный рост паренхимы каждого органа. В отличие от специализированных клеток ЭСК не являются полными автоматами. Сигналы микроокружения существенно влияли как на поведение, так и судьбу незрелых клеток. Факторы среды играли решающую роль в выборе пути рестрикционного созревания стволовых клеток как *in vitro*, так и *in situ*. Стволовые клетки мозга и полового зачатка характеризовались повышенной выживаемостью в переживающих фетальных тканях (клоны нейтральных стволовых клеток удавалось выделить после 48-72 ч хранения ткани в холодильнике при +4С°). Поскольку парциальное содержание O<sub>2</sub> в стволовых пространствах меньше чем в артериальной крови (2-3%), то измерение выживаемости ЭСК в стандартной газовой фазе культуры давали заниженные результаты. В ряде случаев выращивали СК при низком содержании кислорода в газовой фазе (Chakravarthy M.V., Spangenburg E.E., Booth F.W., 2001).

Первая плюрипотентная провизорная ткань зародыша мыши в количестве 600 клеток эпибласта появлялась на 6,5 дне беременности. Клетки эпибласта под влиянием экстраэмбриональной мезодермы подвергались эпителиомезенхимальной трансформации. Эти уникальные 600 клеток генерировали в течение нескольких циклов пролиферации коллекцию “founder cells” для всех закладок органов (Marshak D.R., Gottlieb D., Gardner R.L., 2001). Сегрегация герментативных клонов также происходила в эпибласте. К сожалению, клетки эпибласта невозможно идентифицировать по морфологическим деталям. Все клетки эпибласта маркировались поверхностным белком *Crypto*, содержащим домен EGF и участок,

богатый цистеином (Beddington R., Robertson E.J., 1999). Зародыши мыши *Crypto*-/- останавливались в развитии на стадии эпибласта. Если максимальное число клеток в эмбриобласте мыши составляет порядка 350, то в эпибласте численность клеток достигает 600. Поскольку клетки эпибласта интенсивно мигрируют и перемешиваются, это объясняет интенсивную химеризацию зародышей донорскими ЭСК, пересаженными в бластоцисту (Patrick P., Tam L., Gam G.M. et al., 2001). В эпибласте формируются главные центры клонального размножения и направленной миграции прогениторных клеток. Здесь начинается формирование зародышевых листков. Центральное событие гаструляции – это превращение двухмерной мозаики клеток эпибласта в трехмерный зародыш.

Пересадки нормальных ЭСК в зародыш *Crypto*-/- позволяли формировать химерную первичную полоску – вторую важнейшую провизорную плюрипотентную ткань. Этап формирования осей развития и миграции эпибласта маркировался экспрессией следующих генов: *Hes-1*, *Lim-1*, *HNF3*, *Otx-2*. Перечисленные гены необходимы для инициации сегментации зародыша. Любая нокаут мутация этих генов частично или полностью компенсировалась пересадкой нормальных ЭСК в эпибласт. Нескольких нормальных тотипотентных клеток в зародыше достаточно, чтобы пройти лимитирующую стадию органогенеза, где временно работает транскриптаза (типа *Crypto*). Ранние гены развития мозаично включаются лишь в части эпибласта, а не сразу во всех клетках. Это открывает новые способы внутриутробной клеточной реконструкции наследственных дефектов развития и тератогенеза. Надежная визуализация клеток эпибласта возможна только с помощью цветных белков, поставленных под промотер ранних генов (например, гена *Crypto*).

До сих пор не удалось превратить ЭСК в бластоцисту или клетки эпибласта. Получение лабораторного эпибласта из ЭСК – дело ближайшего будущего. Первые попытки получения эпибласта из ЭСК мышей в условиях культуры уже опубликованы (Rathjen J., Lake J.A., Betesse M.D. et al., 1999). ЭСК выращивали в среде ДМЕМ/Игл с 10% FCS без фидера, с добавлением LIF и кондиционированной среды после выращивания клеток гепатомы HEP-G2. Дифференцировка эмбрионидных агрегатов начиналась после удаления из среды LIF. В фазе пролиферации ЭСК экспрессировали типичные маркеры плюрипотентных незрелых клеток – *Ost4*, щелочную фосфатазу,



LIF, IL-6–рецептор, SSEA1- поверхностный антиген клеток. После остановки пролиферации дифференцировку контролировали по динамике экспрессии трех «ранних» генов. Созревание клеток эпибласта (первичной эктодермы) маркировали по нарастанию экспрессии мРНК гена FGF-5. Синхронно происходило снижение уровня мРНК генов Rex-1 и Gbx-2 до нулевого уровня в случае полной дифференцировки незрелых ЭСК в клетки эпибласта. Зрелые клетки эпибласта, возникшие *in vitro*, характеризовались утерей мРНК Oct4, Rex-1 и Gbx-2, но высоким уровнем мРНК FGF-5. Утрата Oct4 по времени совпадала с утерей способности новообразованных клеток эпибласта встраиваться в бластоцисту и химеризовать эмбриобласт ранних зародышей. Существенно, что образование клеток первичной эктодермы из ЭСК в культуре имело обратимый характер. При добавлении LIF и среды для выращивания ЭСК, фенотип клеток первичной эктодермы за две недели возвращался к фенотипу исходных плюрипотентных ЭСК мышей.(Rathjen J., Lake J.A., Bettesse M.D. et al., 1999).

ЭСК, полученные пересадкой ядер соматических клеток, проложили путь к изучению переноса поведенческих навыков и элементарных физиологических программ у реципиента. С помощью пересадок ЭСК человека в сетчатку, гиппокамп, таламус, кору больших полушарий достигли ощутимой «гуманизации» органов чувств и мозга животных с целью отследить эффект трансплантата на высшие функции ЦНС. Начало было положено передачей характерных навыков пения от перепела цыпленку с помощью пересадки кусочков нейроэктодермы (Long K.D., Kennedy G., Valaban E, 2001). Границы допустимых вмешательств в реконструктивной физиологии животных еще неотчетливо видны, поскольку не известен конечный результат таких действий.

Трансплантируя стволовые клетки, экспериментатор повторяет «слепые игры» эволюции с клетками мозга, приоткрывая пути участия стволовых клеток в сборке и сортировке сетей ЦНС. Если эволюция вслепую испытывает возможности ЭСК в сборке органов, то экспериментатор ищет идей и подтверждений того, каким образом стволовые клетки могут быть использованы в медицине для лечения заболеваний. Необходимо подчеркнуть, что **эксперименты** с пересадкой ЭСК человека всегда ограничены опытами на животных. Никакие знания на животных не могут служить полным обоснованием и достаточной платформой для апробации ЭСК на человеке.

Только клиницист, а не экспериментатор определяет новые критерии и меру риска, позволяющие начать **клинические испытания** стволовых клеток как новый способ помощи больным людям, остающимся без лечения, с целью спасения или продления их жизни. Жестких правил и критериев, позволяющих транслировать знания предклиники в начало клинических испытаний, по-видимому не существует из-за сложности и невоспроизводимости многих ситуаций у постели больного, где начинает действовать многолетний опыт и экспертиза врача. Фундаментальные исследования ЭСК остаются лишь частью знаний, которые использует клиницист для принятия решений в новых ситуациях.

### **3. Основные источники и способы выделения ЭСК (историческая справка)**

Хотя концепция стволовой клетки была предложена Александром Максимовым в 1908 г для кроветворной ткани, статус большой науки эта область получила в последнее десятилетие XX века. Первая попытка лабораторного оплодотворения яйцеклетки млекопитающих датирована 1878 г. Но лишь в 1959 г. в США был получен первый кролик путем искусственного оплодотворения. Первые природные тотипотентные клетки человека оказались в руках экспериментаторов только в начале 60-х годов.

В начале 70-х годов XX века Leroy Stevens обнаружил высокую частоту спонтанного возникновения **тератокарцином** в половых зачатках мышей линии 129. Эти опухоли для экономии он размножал в брюшной полости взрослых животных той же линии (а не в дорогостоящей культуре клеток). Среди конгломератов опухолевых клеток наблюдал появление неорганизованных популяций дифференцированных клеток: фрагментов кожи, хряща, волос, скопления миоцитов и кардиомиоцитов, кроветворной ткани (Репин В.С., 2000). Спонтанно возникшие тератокарциномы в культуре росли неприкрепленными клонами пролиферирующих плюрипотентных клеток, из которых часть подвергалась спонтанной дифференцировке в специализированные клетки (производные всех трех зародышевых листков). Стивенс первый высказал догадку, что дифференцированные клетки образуются не из раковых

клеток, а из малой примеси пролиферирующих плюрипотентных половых зародышевых клеток, которые он описал как «эмбриональные стволовые клетки» (ЭСК) . С этой первой работы термин ЭСК прижился в литературе. В начале 70-х Stevens и Solter независимо друг от друга нашли второй источник эмбриональных стволовых клеток. Пассированную линию плюрипотентных эмбриональных клеток можно получить, если предимплантационные зародыши мыши вводить в брюшную полость, либо под кожу взрослым мышам. В 1975 году Минц доказала, что введение предимплантационных зародышей мыши/крысы в любую ткань вне матки ведет к образованию опухоли из части клеток зародыша (эмбриокарцином). Высокоочищенные линии **эмбриокарциномы (ЭК)** были получены в результате многочисленных пассажей культуры через многие поколения животных. Авторы сразу обратили внимание на сходство поведения и фенотипа **(ЭК) и тератокарцином (ТК)**. В культуре плюрипотентные клетки размножались клонами, причем часть клеток, покидавших клоны, подвергались разнообразной спонтанной дифференцировке. При этом клетки в клоне продолжали интенсивно самообновляться после многочисленных пассажей. Разными способами удавалось повышать число клон-иницирующих клеток в культуре. Таким образом было доказано, что плюрипотентность наследуется новыми поколениями клеток, возникающими в клоне, однако быстро теряется вне клонов. Упомянутые авторы первыми показали, что присутствие фидера (монослоя фетальных фибробластов) позволяет сохранять больше плюрипотентных клеток в культуре. В дальнейшем из опухолей, размноженных пассажами через животных, удалось изолировать несколько линий **эмбриокарцином**. После Стивенса во многих лабораториях мира было изолировано более 100 линий **ЭК (эмбриокарцином) и ТК (тератокарцином)**. Для лабораторных исследований линии мышинной тератокарциномы (129/sv, F19, F8, JM-1, E14TG2f, Zin40, CGR 86, R1, SSE) до сих пор остаются самой распространенной, дешевой моделью плюрипотентных клеток. Множество линий **ТК и ЭК** коммерциализованы биотехнологическими компаниями с готовым клеточным паспортом (иммунофенотип, хромосомный анализ, профиль экспрессии мРНК, профиль рецепторов и белков внутриклеточной сигнализации). Рядом авторов предложена классификация **ТК** как по происхождению, так и фенотипу клеток (Andrews P.W., Przyborski S.A., 2001). Существенный недостаток большинства линий

ТК - быстрая утрата тотипотентности в пассажах, ограниченный потенциал цитодифференцировки клеток. Многие линии ТК оказались анеуплоидными, а потому генетически нестабильными (имеется в виду фенотип клеток в пассажах), что снижает воспроизводимость результатов. Сопоставление фенотипа ЭСК и ТК привело Пирса к важной гипотезе о том, что многие опухоли возникают как ошибки созревания региональных стволовых клеток (Pierce, 1974). Для многих раковых линий характерна генетическая нестабильность, как и для анеуплоидных линий ТК. Вторым недостатком **ТК и ЭК** является риск малигнизации трансплантата. Третьим недостатком ТК и ЭК является смешанная дифференцировка прогениторных клеток в культуре. По этой причине линии ТК чаще всего использовались в опытах на животных в предклиническую фазу для изучения судьбы трансплантата (миграция, пролиферация, дифференцировка клеток, апоптоз, реваскуляризация трансплантата, сроки выживания в разных органах). Описано несколько линий **ТК** человека (N2, NTERA-1, NTERA-2). По соображениям биоэтики не было попыток получения **ЭК** человека.. Однако высокоочищенные линии ТК человека, проверенные по стандартным критериям биобезопасности, уже используются в клинических испытаниях, в том числе в виде клеточных трансплантаций для коррекции клинических проявлений заболевания. Эти тщательно отобранные линии сохраняют стабильный кариотип, высокий потенциал цитодифференцировки и имеют высокий индекс встраивания в ранние зародыши..

В конце 70-х XX века Беатрис Минц и Карл Илменси из Ракового института (Филадельфия, США) первыми получили аллофенных зародышей мышей, смешивая в чашке петри клетки **ТК** с клетками нормальных предимплантационных зародышей (стадия 8-64 клеток). Зародыши - химеры из лабораторных и природных зародышевых клеток нормально развивались, проходили без аномалий внутриутробный период развития, а позднее нормально развивались в постнатальном периоде. Этим методом впервые получены межвидовые химерные организмы. Гетерогеномные зародыши реализовали один план морфогенеза без морфологических уродств. Пересадки **ТК** в предимплантационные зародыши не нарушали работу генов сегментации и гомеозиса, контролирующих 3D - карту зародыша. Это открытие сделало возможным пересадки ТК для коррекции наследственных метаболических болезней, поскольку пересадки ЭСК не сопровождалась аномалиями морфогенеза.

Использование фидерного слоя клеток для поддержания тотипотентности линий ТК оказалось полезным новшеством для следующего шага: выделения ЭСК из бластоцист мышей (Evans, Kaufman, 1981; Martin, 1981). Во-первых, клетки эмбриобласта нужно было отделить от трофобласта в культуре. Трофобласт мешал созреванию эмбриобласта в клетки эпибласта. Во-вторых, добавление 10-20% FCS+ меркаптоэтанол способствовало созреванию изолированных клеток эмбриобласта в клетки эпибласта. В-третьих, образование вторичных клонов эпибласта было необходимым условием возникновения ЭСК с неограниченным потенциалом пролиферации (Smith A.G., 2001).

Ранние (предимплантационные) зародыши и фетальная абортная ткань оставались главными природными источниками ЭСК. Зародыш на стадии бластоцисты представляет собой типичную «стволовую нишу», в которой впервые четко разделены тотипотентные стволовые клетки эмбриобласта и поддерживающие клетки трофобласта (своеобразный фидер) (Рис 1-5-А). Клетки трофобласта вырабатывали кофакторы выживания и защиты, необходимые для сохранения и пролиферации плюрипотентных клеток внутреннего зародышевого слоя. Одновременно они блокировали неконтролируемую пролиферацию эмбриобласта (позже – эпибласта) *in situ*. Малая доля клеток эмбриобласта бластоцисты сохраняла тотипотентность (1-2% клеток удавалось переводить в бессмертную самовоспроизводящуюся линию ЭСК). Репрограммирование эмбриобласта в линию ЭСК начиналось с механического отделения эмбриобласта от трофобласта. Затем фрагменты эмбриобласта помещали на «фидер» из фетальных фибробластов без факторов, ограничивающих пролиферацию тотипотентных клеток. Первые попытки выделения ЭСК сделал Пирс в 1957 г. Историю вопроса можно найти в превосходном обзоре (Andrews P.W., Przyborski S.A., Thomson J.A., 2001).

В середине 70-х годов А.Я. Фриденштейн и сотр . показали, что строма гематогенной ткани взрослых мышей и человека содержит самообновляемые плюрипотентные клетки, которые можно клонировать в линии (Friedenstein A.J., Chailachyn R.K., Latsinik N.V. et al., 1974, Friedenstein A.J., Owen M. 1988). В постмитотическом состоянии клетки этих линий дифференцировались в остеобласты, адипоциты, хондроциты, миоциты. Некоторые линии генерировали эндотелиоциты. В культуре эти линии формировали

колонии фибробластоподобных клеток, хотя клетки размножались симметричными делениями (как прогениторные клетки). Фриденштейн назвал этот вид плюрипотентных клеток мезенхимальными стволовыми клетками. С этих пионерских работ началось изучение стволовых/прогениторных клеток мезенхимы.

Почему получение линий ЭСК мышей было сразу сфокусировано на клетках эмбриобласта? Во-первых, клетки этой ткани имели максимальное фенотипическое сходство с клетками ТК. Во-вторых, только дериваты этих тканей удавалось длительно пассировать в незрелом статусе, сохраняя после многочисленных пассажей способность дифференцировки в разные линии.. В третьих, исходные клетки эмбриобласта никогда не генерировали клеток трофобласта. Это разделение позволяло новым поколениям клеток избирательно встраиваться в морулу/бластоцисту и заселять ткани, возникающие из трех зародышевых листков. Если дериваты трофобласта начинали быстро генерировать полиплоидные клетки, то производные эпибласта автоматически поддерживали нормальный кариотип, были резистентны не только к аномалиям кариотипа, мутациям, но и многим эпигенетическим сигналам. Сразу после имплантации клетки эпибласта зародышей мыши подвергались интенсивной, но ограниченной пролиферации (Dani C., Chambers I., Johnstone S. et al., 1998). Если интенсивно пролиферирующие клоны эпибласта своевременно изолировали из зародыша, затем кондиционировали среду ростовыми факторами, то малая часть клеток приобретала способность к неограниченной пролиферации. Природа этой ключевой трансформации клеток эпибласта остается неразгаданной. Расшифровка сигналов, останавливающих пролиферацию клеток эпибласта в имплантированном зародыше, поможет эмпирическим поискам условий лабораторного и полупроизводственного наращивания клеток эпибласта в автоматическом режиме. Уже очевидно, что ЭСК найдут широкое применение в качестве высокоаффинного вектора доставки новой ДНК в ранние зародыши как с исследовательскими, так и медицинскими целями.

Недавно было показано, что линии мышинных ЭСК с генотипом 40ХУ возникают легче, чем линии с генотипом 40ХХ. Более того, пересадки ЭСК с мужским генотипом 40ХУ в зону полового бугорка у зародыша самки вело к смене пола у развивающихся зародышей (Smith A.G., 2001).

В середине 80-х очередной методический прорыв осуществил Marius Capecchi, разработавший метод двойного выключения (нокаута) материнской/отцовской аллели гена в ЭСК мышей. Этот подход оказался незаменимым для изучения функции известных/неизвестных генов в раннем эмбриогенезе мышей. При смешивании 60-80 “нокаут”-ЭСК с 20-30 клетками нормальных ранних зародышей мыши получают развивающуюся химеру, закладки органов которой включают разные пропорции донорских/реципиентных клеток. С помощью таких химер открыты функции многих генов органогенеза, зародышевых листков, гомеозиса и сегментации. Метод двойного нокаута пока эффективно работает только на ЭСК мышей, но не других млекопитающих. За последние годы техника химеризации ранних зародышей продвинулась вперед с помощью трансфицированных донорских ЭСК, маркированных так называемыми генами цветных белков. Многие морские беспозвоночные используют язык флуоресцентных белковых молекул для коммуникации в абсолютной тьме на большой глубине океана. Донорские клетки, окрашенные разными белками, можно вводить в ранние зародыши и отслеживать судьбу живых клеток прямо под флуоресцентным микроскопом. Можно в ЭСК вводить лишний ген под бактериальным промотором, реагирующим на тетрациклин. Этим способом можно включать внесенный ген в зародышах, внося в среду антибиотик. Процесс химеризации зародышей можно проследить в динамике с момента введения донорских клеток, изучать пролиферацию, миграцию и судьбу донорских популяций в разных частях зародыша, в том числе в динамике методом цейтраферной съемки.

В настоящее время ЭСК мыши с двойным нокаутом практически любого гена поставляются на рынок биотехнологическими компаниями за 1500-2000 ам.долларов/2-3 млн клеток. За последние годы техника химеризации ранних зародышей донорскими стволовыми клетками достигла пределов эффективности. Так, пересадки одной гематогенной стволовой клетки человека в 8-клеточный зародыш мыши вызывали “гуманизацию” сразу нескольких органов мыши.

С помощью двойных делеций в ЭСК удалось получить мышей, копирующих мышечную дистрофию Дюшенна, наследственную атаксию-телангэктазию, другие наследственные фатальные заболевания детей. Современная биология пополнилась

новым каталогом болезней мышей, копирующих основные наследственные болезни человека.

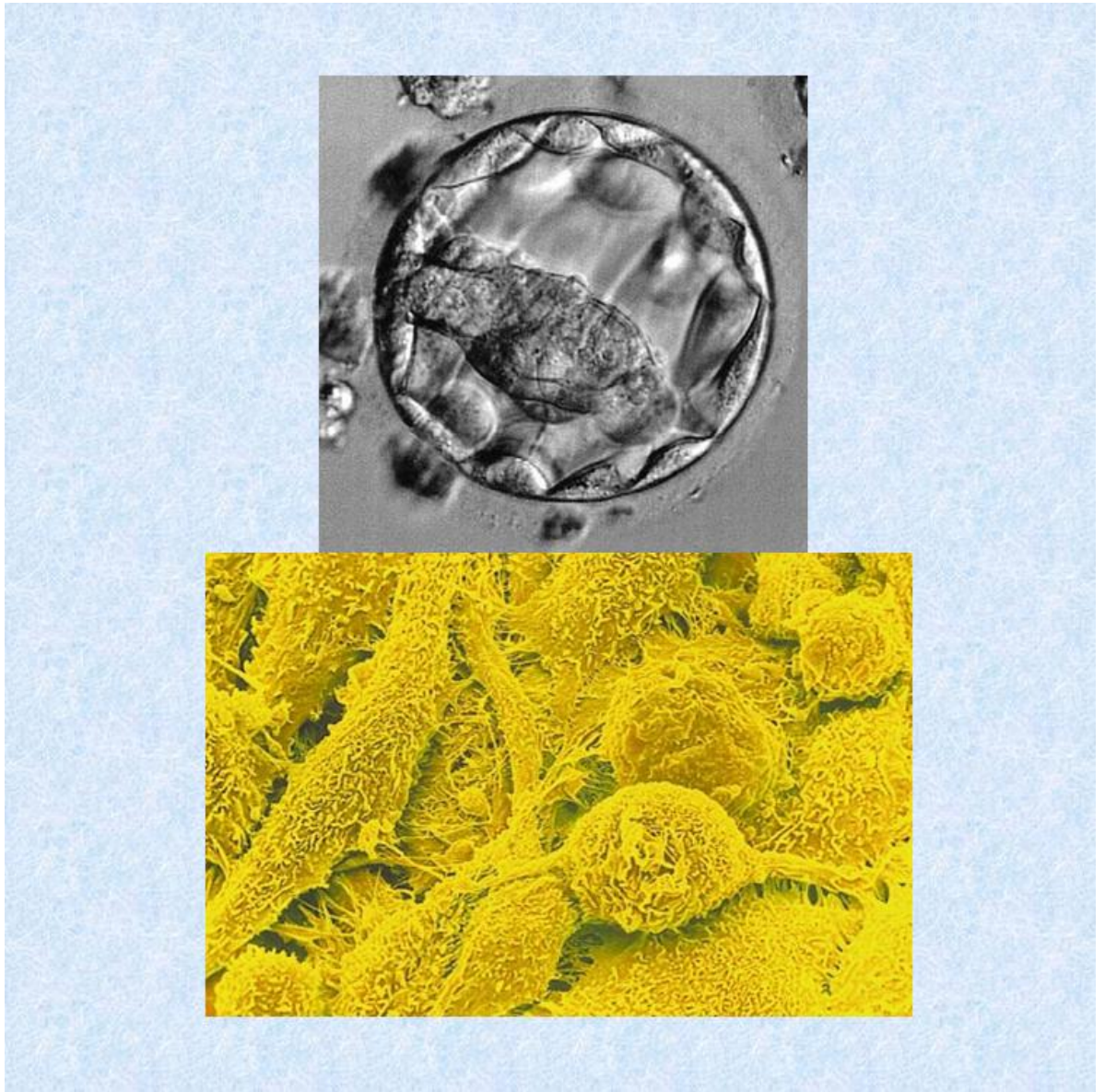
Мартин получил первую линию ЭСК мышей из бластоцисты в 1981 г. (Martin, 1981). В 1984-88 гг Эндрюс создал технологию получения "лабораторных" нейронов человека из линии тератокарциномы NTERA-2. В 1989 г описаны методы дифференцировки ЭСК тератокарциномы человека практически в любой тип специализированных клеток взрослого организма. В 1994 г Брижит Хоген из Вандербилтского ун-та, Нэшвилл, США опубликовала метод выделения примордиальных прогениторных клеток (ППК) из полового зачатка зародышей мыши. В 1995-96 гг Томсон изолировал бессмертные линии ЭСК из бластоцисты обезьяны. Качественные сдвиги в этой проблеме возникли в 1998 г после изолирования бессмертных линий ЭСК человека. Решающую роль сыграла компания Герон из Калифорнии, которая вложила в исследования Томсона и Герхарда 5 млн долларов. Государственные академические учреждения наложили мораторий на эти исследования. Этот вклад фирмы обернулся новой биологией. Изолирование ЭСК человека авторитетный журнал Science назвал третьим по важности открытием в биологии XX века (после открытия двойной спирали и программы «Геном человека»). С середины 90-х годов не прекращались попытки получения линий ЭСК человека в нескольких лабораториях США, Великобритании, Канады, Индии, Австралии/Синапура, Японии.

В 1998 г ин-т репродуктивной биологии в Норфолке (Канада) первым наладил производство бластоцист человека из банка спермы и яйцеклеток. На втором этапе бластоцисты использовались для выделения линий ЭСК человека. Однако канадцы не успели первыми изолировать линию ЭСК человека из «лабораторных» бластоцист.

В 1998 г Джеймс Томсон (Висконсинский ун-т, США) изолировал 5 линий ЭСК из замороженных бластоцист человека, оставшихся неиспользованными после суперовуляции и получения оплодотворенных яйцеклеток с целью получения беременности (Thomson J., Itskovitz-Eldor J, Shapiro S.S., 1998). Оригинальный метод получения ЭСК из бластоцисты человека изложен в знаменитом патенте 6.200.806, полученном в марте 2001 г Wisconsin Alumni Res Foundation (WARF). Патент частично



продан фирме Geron на получение некоторых специализированных клеток человека (нейроны, кардиомиоциты, клетки печени, поджелудочной железы).



**Рис 1-5 Устройство бластоцисты (А) - под ф/к микроскопом (Б) - ошаренные ППК на подложке из вытянутых клеток Сертоли (сканирующая электронная микроскопия)**

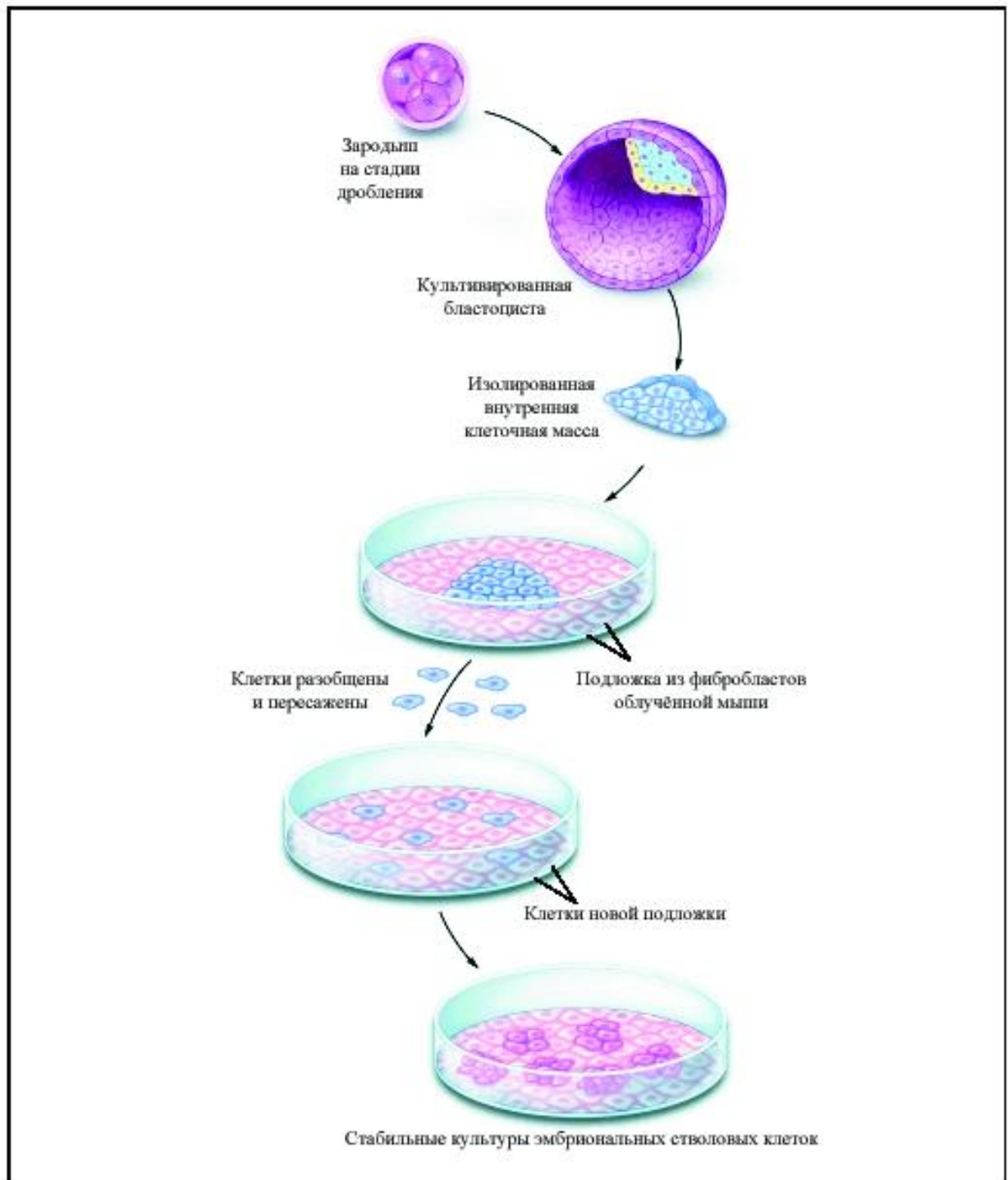


Рис 1-6. Выделение ЭСК из бластоцисты человека

Зародыши обязательно замораживали перед выделением ЭСК. Известно, что после замораживания большинство зародышей теряли способность проходить без отклонений послеимплантационный период развития в матке (одно из требований биоэтики для использования «остатков» зародышей после операции искусственного оплодотворения). После размораживания в среде Дульбекко с помощью игл и микроманипулятора выделяли эмбриобласт, предварительно помеченный флуоресцентно мечеными антителами. Мелко нарезанную ткань эмбриобласта выращивали в той же среде Дульбекко 9-15 дней над облученным фидером фетальных фибробластов с добавлением трех ростовых цитокинов (LIF, IL-6, SCF). Клетки в культуре интенсивно делились, формируя множество новых клонов по периферии микроэксплантатов эмбриобласта. Эти выросшие по краям эксплантата однородные колонии аккуратно собирали и повторно диспергировали (но не до одноклеточной суспензии). В суспензии ЭСК росли клонами, которые вновь диссоциировали пипетированием. Максимальную скорость экспансии клонов достигали повторной диссоциацией агрегатов на стадии 10-15 клеток. Новые клоны возникали через 5-7 суток. Каждый клон переносили в микроячейку и выращивали до агрегата из 40-50 клеток. Процедуру повторяли в пассажах, увеличивая плотность до 6-10 миллионов на чашку Петри (6 см). Из клонов удалось выделить несколько XX и XY линий ЭСК человека, которые через 100-120 пассажей сохраняли высокий темп клеточных делений, высокую активность теломеразы, минимальный белковый фенотип, тотальную полноту генома. Незрелые ошаренные клетки в мелких интенсивно пролиферирующих клонах экспрессировали на поверхности общий гетеродимерный рецептор для LIF, SCF и IL-6. В присутствии указанных митогенов сигнал от рецептора передается через трансмембранную субъединицу GP-130 в ядро. Детали устройства и работы этого рецептора показаны на рис (Рис 1-9). Активная сигнализация через рецептор в ядре блокировала остановку клеток в  $G_0$ -фазе, стимулируя немедленную инициацию  $G_1$ -фазы.

Дифференцировка ЭСК начиналась (после смены среды, удаления фидера и LIF, добавления сыворотки) с прикрепления клеток к подложке и формирования цитоскелета. Ни одна из линий не являлась клоном, т.к. была получена не из одной клетки (а из кластера клеток). Рост клонов шел периферией. В фазу равновесия

пролиферация прогениторных слоев уравнивалась апоптозом и миграцией клеток из клона. Рост клоногенной культуры определяли тремя параметрами: а) числом клонов/мл, б) долей клеток в клоне/общее число клеток в культуре, в) скоростью обновления клонов в культуре. Линии ЭСК в культуре формировали суспензионные клоны двух типов: а) плотные симметричные сферы, б) рыхло собранные уплощенные колонии. Компактные сферы были резистентны к трипсину и пипетированию, тогда как рыхлые неправильные колонии диспергировали на отдельные клетки, как трипсином, так и механически.

В отличие от ЭСК мыши, линии ЭСК человека для сохранения пролиферации без дифференцировки требовали фидерного слоя клеток и LIF одновременно. Без LIF и фидера ЭСК прикреплялись к подложке, делились и формировали монослой из продвинутых дифференцированных клеток. Сохранение потенциала пролиферации и незрелого фенотипа не являются частью автоматки этих клеток, а требуют специальных условий для реализации. При малых плотностях культивирования добавляли bFGF или сыворотку для поддержания пролиферации. Появился метод длительного пассирования (250 пассажей в течение года) линии ЭСК человека без фидера на поверхности матригеля в среде, кондиционированной супернатантом от выращивания фетальных фибробластов (Xu C., Inokuma M.S., Denham J. et al., 2001). Благодаря матригелю, удавалось нарастить больше клонов в единице объема. Поверхность микрочастиц матригеля была покрыта ламинином. ЭСК с помощью рецептора к ламинину прикреплялись к поверхности микрочастиц и формировали клоны (ламининовый рецептор – единственный рецептор клеточной адгезии, экспонированный на поверхности ЭСК человека и тератокарциномы). Даже при добавлении кондиционной среды после выращивания фетальных фибробластов и LIF, скорость роста клонов ЭСК оставалась невысокой (на порядок ниже, чем у Томсона). Без добавления супернатанта от фидера клоны ЭСК быстро теряли Oct-4 и вступали в скрытую фазу дифференцировки. Одиночные клетки после прикрепления автоматически дифференцировались. Образование смешанной культуры из дифференцированных распластанных по гелю клеток и клонов ЭСК было вторым недостатком метода.

Линии ЭСК человека, трансплантированные в виде суспензии одиночных незрелых клеток, генерировали тератомы в тканях взрослых иммунодефицитных животных (Odorico J.S., Kaufman D.S., Thomson J.A., 2001).

В 1998 г Джон Герхарт (Ун-т Джона Гопкинса, Балтимор, США) впервые изолировал бессмертные линии половых прогениторных клеток (ППК) из полового зачатка фетусов 4-5 недели гестации. Через 2-3 недели половой зачаток человека необратимо изменялся, хотя фенотипически сохранял те же клетки. Однако выделить ППК в виде бессмертной линии из зародышей более поздних сроков пока никому не удалось. ППК возникают в желточном мешке на 3-й неделе развития. Эти экстраэмбриональные провизорные клоны через 1-2 недели мигрировали в зону половых бугорков зародыша, где формировали "дормантные" популяции прогениторных плюрипотентных клеток. Значительная часть ППК сохраняется без изменений в зародыше вплоть до рождения. С ППК работать легче, поскольку этой ткани в фетусе больше, чем клеток эмбриобласта (Shamblott M.J., Axelman J., Gaerhart J. et al., 1998). Технология получения ППК запатентована в 1998 г (патент 6245566 от 12 июня 2001 г). Пересадки аллогенных ППК уже используют для лечения мужского бесплодия, поскольку донорские клоны ППК хорошо встраиваются и колонизируют иммунопривилегированные вакантные зоны эпителия канальцев (Shinohara T., Avarbok M.R., Brinster R.L., 1999; Shinohara T., Orwig K., Brinster R.L., 2001). Данный метод особенно важен для получения зародышей-трансгенных химер, которые переносят новый генетический вектор в половые клетки и обеспечивают вертикальную передачу нового гена потомству. Существенно и то, что с фетальной абортной тканью можно работать в исследовательских лабораториях. Изолированную ткань полового зачатка 4-5 недельных фетусов диспергировали до взвеси одиночных клеток с помощью смеси коллагеназы IV-V, гиалуронидазы и ДНКазы. Ферментативное отделение ППК от стромальных клеток Сертоли необходимо для активации пролиферации ППК. Клетки Сертоли синтезируют набор антимитогенов и специальных факторов, удерживающих ППК в неактивном «дормантном» состоянии (Рис 1-6-Б)

Первичную культуру ППК также выращивали над слоем фидера (первый-второй пассаж фетальных фибробластов). Для стимуляции пролиферации ППК в среду

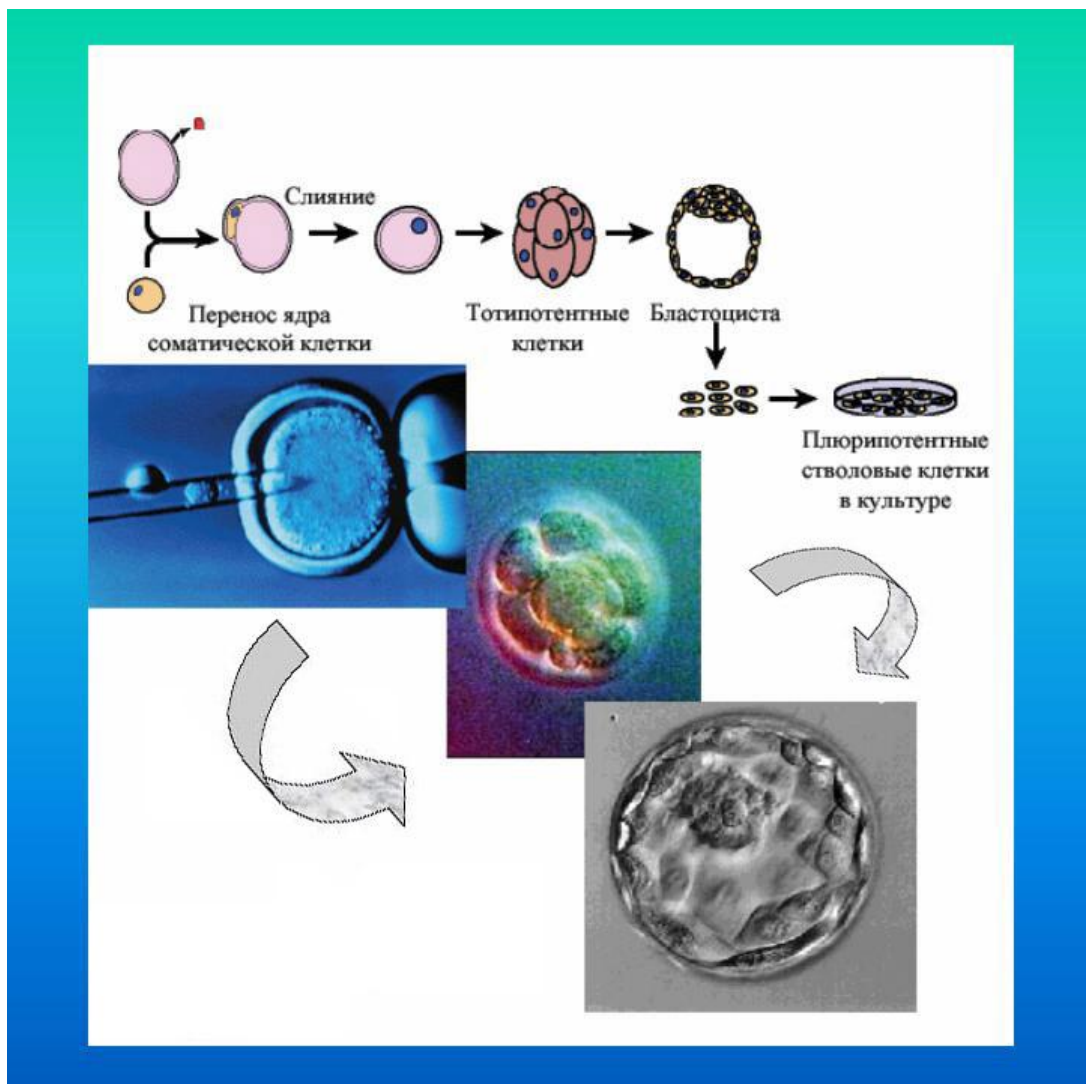
добавляли bFGF, LIF и форсколин (стимулятор уровня цАМФ). В культуру ППК добавляли также 15% фетальную сыворотку (HyClone). Преобладающая часть клеток размножалась суспензионными клонами.

На следующем этапе изолировали самые крупные интенсивно пролиферирующие колонии с множественными пузырьками (кистами). Возникающие клоны являются истинными первичными клонами (в отличие от эмбрионидных телец, которые являются вторичными агрегатами клеток, вступающими в фазу дифференцировки). Активно пролиферирующие клоны составляли примерно 2-5 % клеток от всей клеточной массы ППК. Лишь малый процент первичных клонов сохранял высокий темп пролиферации клеток. Эта спонтанно растущая плюрипотентная ткань содержала одновременно нестин+, виментин+, GFAP+ клетки (варианты нейрональных стволовых клеток). Эти же клеточные массы содержали стволовые гематогенные, мышечные, мезенхимальные стволовые клетки, маркеры предшественников эндотелия, а также маркеры эндодермы. Одновременно многие клетки в составе этих агрегатов имели экспрессированные мРНК трех зародышевых листков и мезензимы (Schamblott M.J., Axelman J., Littlefield J.W., et al., 2001). Выращенная плюрипотентная ткань на стадии появления маркеров региональных стволовых клеток имела две особенности. Во-первых, пересадки этой ткани SCID- мышам не давали опухолей (в отличие от линий ЭСК). Во-вторых, ткань содержала мощные пролиферирующие клоны, которые сохраняли высокий темп делений через 50-70 пассажей. Исследования генетической тотипотентности эмбрионидных телец как *in vitro*, так и *in vivo* опровергли старую концепцию, что судьба стволовых клеток окончательно определена их положением в трех зародышевых листках или мезенхиме. Скорее высокая пластичность плюрипотентной ткани, возникающей первично из эмбрионидных телец, на основе синергизма стволовых клеток и сложных межклеточных взаимодействий - это пока предел возможного в биологии, установленный эволюцией. Именно этот суммарный потенциал стволовых клеток открывает новые возможности для регенеративной медицины.

Дифференцированные клетки, возникающие спонтанно при культивировании эмбрионидных телец (вторичных дифференцирующихся агрегатов), являлись главным блоком выживания стволовых клеток. Своевременное удаление примеси

дифференцированных клеток из эмбрионидных агрегатов восстанавливало нормальное обновление клонов и темп пролиферации (Mountford P., Nichols J., Zevnik B. et al., 1998).

Четвертый способ получения ЭСК человека был предложен сотрудниками Гарвардской медицинской школы в Армхерсте (Cibelli J., Stice I.C., Robl J.M. et al., 1998). С помощью электрического разряда соматические клетки фетуса (в ряде опытов- клетки самих исследователей) сливали с яйцеклеткой коровы, из которой был удален собственный пронуклеус. Такая "лабораторная химера", собранная из клеток двух видов млекопитающих, вела себя как зигота в культуре, развиваясь нормально до стадии бластоцисты (Kato Y., Tani T., Sotomaru Y. et al., 1999).





### **Рис 1-7. Получение ЭСК переносом ядра соматических клеток в оопласт**

После имплантации в матку коровы такие "химерные зародыши" нормально проходили органогенез и заключительные фазы внутриутробного развития. В 1996 г студент-стажер Жозе Сибелли в лаборатории Джеймса Робла получил цитогбриды, собранные из ядра собственной соматической клетки, которое он пересадил в цитопласт коровы. Такие тотипотентные клетки в культуре стали развиваться до стадии бластоцисты. Результаты опытов были доложены президенту Клинтону, после чего на эти эксперименты был наложен мораторий.

Введение ЭСК крыс в зародыш мыши заканчивалось рождением мыши, органы которой были мозаично собраны из клеток крысы и мыши. Межвидовая химеризация зародышей млекопитающих породила множество нерешенных биоэтических и правовых вопросов. Потенции, генетические пути развития, возможности межвидовой сборки зародышей, особенно с использованием генома и ЭСК человека остаются неизученными. Второй способ клонирования зародышей связан с прямым переносом ядра соматической клетки (либо ядра ЭСК) в цитоплазму яйцеклетки того же вида, из которой был удален собственный пронуклеус. Вторая методика позволяла серийно клонировать бластоцисты (Wakayama T., Rodrigues I., Perry A.C. et al., 1999, 2001). Возраст донорских клеток существенно влияет на жизнеспособность и аномалии развития клонированных зародышей (Colman A., Kind A., 2000). Частота анеуплоидии, хромосомных aberrаций и туморигенеза также возрастала в клонах с ДНК от клеток, взятых от пожилых доноров. Аномалии импринтинга в ранних зародышах, обусловленные нарушением гиперметилирования промотерных участков, служат ранним предвестником развивающейся генетической нестабильности клонов. Как известно, эффективность клонирования зародышей амфибий резко зависела от возраста клеток-доноров ДНК. Клонирование лягушек с помощью ядер эндодермы головастика шло с эффективностью 2%, тогда как ядра клеток взрослых лягушек постоянно давали нулевой результат (Kikyo N., Wolffe A.P., 2000). У мышей тотипотентность сохраняется до стадии 8 бластомеров. Только пересадки ядер зародышей до стадии 8-клеточных зародышей оказались эффективными для репродуктивного клонирования (полного воспроизводства зародыша и

новорожденного по ДНК уже существовавших соматических клеток животного). Утеря тотипотентности резко снижала эффективность клонирования ранних и поздних зародышей вследствие множественных поломок эмбриогенеза. Поэтому методики репродуктивного клонирования целесообразно отлаживать и стандартизовать, используя максимально однородные ядра одной линии ЭСК (прежде всего мышей). До создания высокоэффективных и надежных методов репродуктивного клонирования преждевременно обсуждать проблему клонирования животных. Для проверки «репрограммирования» ядра соматической клетки до состояния тотипотентности предложено несколько методов, в том числе по способности рекапитулировать эмбриогенез мышинной бластоцисты после инъекции донорских клеток человека. Появление «гуманизированных» ростков клеток в зародыше и новорожденной мыши свидетельствует о тотипотентности генома созданных цитогбридов, полученных техникой пересадки ядра соматической клетки (Cibelli J.B., Stice S.L., Golueke P.J. et al., 1998). Эффективность репрограммирования генома соматической клетки будет оцениваться независимо в промежуточном эксперименте, прежде чем выполнять весь эксперимент по репродукционному клонированию организма.

После переноса ядра ЭСК в яйцеклетку у части ядер достигалась максимальная тотипотентность к рекапитуляции начального и позднего эмбриогенеза, хотя в других тестах генетические потенции ядер ЭСК не были эквивалентны оплодотворенной яйцеклетке. ЭСК важны для клонирования редких животных. Вырожденность *software* органогенеза лучше изучать на предельно однородном генетическом материале (Kikyo N., Wolffe B., 2000).

Пересадки ядра дифференцированных клеток в цитоплазму ооцита сопровождаются потерей 75% ядерных белков (факторов транскрипции, белков-стабилизаторов гетерохроматина, тотальная смена гистонов-линкеров). Под влиянием нуклеоплазмина цитоплазмы ооцитов происходит удаление белкового каркаса ядер дифференцированных клеток, что ведет к деконденсации хроматина, дестабилизации нуклеосом и полной реорганизацией 3-D структуры хромосом. Импорт белков цитоплазмы ооцита автоматически ведет к реорганизации хроматина в состояние, близкое к тотипотентности, если используются ядра ранних зародышей. Однако

полное автоматическое репрограммирование генома соматических клеток взрослых тканей оказалось пока технически невозможным (Kikyo N., Wolffe A.P., 2000)

Как известно, на лабораторное получение/разрушение зародышей человека для научных целей в США и ряде западных стран наложен мораторий. Линии тотипотентных клеток, дублирующие программы развития в обход беременности, вызывают в обществе много биоэтических сомнений, включая риск злоупотреблений. В США и ряде западных стран заморожен проект создания аутогенных ЭСК человека методом переноса ядра из соматической клетки. Кандидатами №1 на ауотрансплантацию признаны стволовые клетки взрослых пациентов, выделенные из кроветворной, жировой ткани, мезенхимы или волосяных фолликулов эпидермиса кожи. По мнению некоторых экспертов, мультипотентность генома этих клеток достаточна для наработки переживающих ростков донорской специализированной ткани. В 2001 г Vargaret Goodele и Karen Hirschi из Бэйлор колледжа (Хьюстон) показали, что трансплантация донорского костного мозга практически химеризует все органы реципиента. Донорские стволовые клетки в измеряемых количествах достигали поврежденного миокарда или поврежденной печени. В циркулирующей крови взрослых мышей, морских свинок, кролика были обнаружены клон-иницирующие МСК с остеогенным, хондрогенным, миогенным потенциалом. Однако таких клоногенных МСК практически не удалось обнаружить в циркулирующей крови у взрослых людей (Kuznetsov S.A., Mankani M., Gronthos S. et al., 2001). В работе британских исследователей удалось из крови нормальных взрослых людей выделить высокоочищенную фракцию CD34- клеток с варьирующим фенотипом и морфологией, которые удалось очистить на элютриаторе. Практически МСК составляют менее 1% очищенной фракции моноцитов. Однако МСК окрашивались антителами к виментину, CD-105 (эндоглину), коллагену I типа, рецептору витронектина и BMP-2 (Zvaifler N., Matinova L., Burger J. et al., 2000). В культуре пролиферирующие МСК формировали фибробластоподобные клоны. При добавлении индукторов дифференцировки клетки стромы формировали адипоциты, остеобласты или миофибробласты.

Первоначальный оптимизм в отношении возможности мезенхимы органов взрослых людей начал снижаться после открытия особенностей поведения МСК в тканях реципиента. Оказалось, что трансплантированные МСК сливаются с

нейронами, миоцитами, гепатоцитами и другими соматическими дифференцированными клетками, формируя гетерокарионы. Такие гетерокарионы с маркерами МСК и фенотипом дифференцированных клеток принимали за трансдифференцированные МСК. Прежде всего в этой области необходима скрупулезная инвентаризация полиморфизма и функциональной гетерогенности так называемых резервных стволовых клеток мезенхимы, представленных множественными «нишами» в эпидермисе кожи, костно-мышечной, жировой, иммунной и кроветворной системе (Young H.E., Steele T.A., Bray R.A. et al., 2001). Для определения доли стволовых/прогениторных МСК в разных тканях и органах взрослых организмов используют тест с инсулином и дексаметазоном. Все стволовые клетки в культуре под влиянием инсулина пролиферируют, не меняя незрелого фенотипа. Мишенью действия дексаметазона являются прогениторные клетки. Долю прогениторных клеток высчитывают по количеству возникших новых фенотипов клеток, опосредуемых эффектом стероида. Практически все пулы резервных МСК состоят из наборов стволовых/прогениторных субпопуляций с варьирующим фенотипом и генетической потентностью. Мультипотентность линий МСК сужается, особенно в пассажах. Первым исчезает хондрогенный потенциал линий МСК (Tsutsumi S., Shimazu A., Miyazaki K. et al., 2001). Есть косвенные доказательства сохранения “дормантных” реликтов зародышевой мезодермы в мезенхиме взрослого организма, персистирующей *in situ* со стадии органогенеза (Young H.E., Duplaa C., Young M. et al., 2001; Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H. et al., 2001). По фенотипу и плюрипотентности эти клетки невозможно отличить от МСК. Численность стволовых/прогениторных клеток в мезенхимальной ткани взрослого организма значительно больше, чем пул стволовых клеток в паренхиме (Deans R.J., Moseley A.B., 2000). Пока этому факту нет однозначного объяснения. Внутривенные вливания 50 млн МСК -дериватов гематогенной стромы, проведенные на здоровых реципиентах, признаны абсолютно безопасными (нет эффектов на клеточный состав крови, тромбоциты, иммунные клетки и иммунную систему) (Lazarus H.M., Haynesworth S.E., Gerson S.L. et al., 1995; Deans R.J., Moseley A.B., 2000).

Мультипотентность постнатальных стволовых клеток человека изучается на животных. Резервы стволовых клеток больных людей – прямой путь к банкам клеток,

которые найдут более широкое применение, чем банки органов. Этот биоресурс незаменим в борьбе с фатальными заболеваниями органов. Даже в лидирующих странах система добровольного донорства качественных органов обеспечивает помощь 10-15% пациентам, находящимся на листе ожидания. Миллионы пациентов на планете погибают, не дождавшись кардинального лечения. С учетом нарастания эпидемии СПИДа, вирусного гепатита, новых форм особо опасных вирусов, поражающих ниши стволовых клеток, растет потребность в альтернативных источниках клеток человеческих органов. Ткани взрослого человека становятся важным источником стволовых клеток для клиники. Микровкрапления эмбриональной зародышевой ткани сохраняются в костном, головном, спинном мозге, в криптах тонкого кишечника, волосяных фолликулах кожи, строме жировой ткани, в специальных стволовых пространствах глаза, периферических нервах, органах чувств. В здоровой ткани пул ЭСК обеспечивает медленную смену постаревших аномальных клеток на новые здоровые популяции. Как известно, апоптоз изношенных клеток в сочетании с обновлением клеточных популяций служит главным механизмом защиты от болезней (Wei G., Schubiger G., Harder F. 2000). Главная трудность в изучении СК взрослых органов – это преодоление их неактивного, «дормантного» состояния *in vitro* с целью наработки биотрансплантатов. Секреты макромасштабирования таких стволовых клеток – дело недалекого будущего. Получение GMP- трансплантов из ЭСК пациентов-заказчиков - новейшая страница бизнеса.

Пока мало известно, каким путем стволовые клетки нервной ткани контролируют обновление клеток ЦНС (McKey, 1997). Изолированные нейральные стволовые клетки (НСК) мышей линии Rosa, маркированные LacZ геном и бактериальной бета-галактозидазой, активно участвовали в образовании и заселении трех зародышевых листков и органов зародыша-реципиента. Пересаженные НСК частично мигрировали в костный мозг предварительно облученных животных, формируя колонии гематогенных клеток. Пересадки НСК в кровотоки вели к образованию донорских колоний овальных (стволовых) клеток в дуктулярной системе печени. Существуют известные трудности в идентификации ЭСК *in situ*. Многие настаивают, что пролиферативный потенциал ЭСК взрослых тканей ограничен, и потому одновременно нужно создавать альтернативные источники СК для трансплантации.

Клоны стволовых мультипотентных клеток, выделенные из кожи взрослого человека, выделили в культуру с их последующей дифференцировкой в нейроны, глию, олигодендроциты (Toma J.G., Akhavan M., Fernandes K.J. et al., 2001). Стволовые клетки эпидермиса взрослых мышей линии C57BL/6 извлекали из кожи и метили в культуре GFP (флуоресцентным белком). Далее меченые стволовые клетки кожи трансплантировали в изогенные бластоцисты. Затем химеры трансплантировали в матку гормонально подготовленных самок. Распределение донорских флуоресцентных клеток наблюдали на разных сроках пре- и постнатального развития.. Многочисленные ростки донорских клеток верифицировали в разных отделах головного мозга, нервном гребне, печени, почках, коже, других органах. Бластоциста мыши репрограммирует геном пересаженных региональных стволовых клеток взрослых тканей до статуса ЭСК (Liang L., Vickenbach J.R., 2002). Стволовые клетки из жировой ткани взрослого человека стали лабораторным источником дифференцированных линий многих органов и тканей человека (Zuk P.A., Zhu M., Huang J. et al., 2001). В перспективе жировая ткань и кожа взрослых пациентов окажутся важным источником стволовых клеток для аутогенной трансплантации.

**Таблица 1. Потенции и характеристики ЭСК взрослых тканей**

---

Ограниченная пролиферация
Низкая теломераза
Мультипотентность генома
Полная иммуносовместимость
Создание банка клеток до собственного заболевания
Создание семейного банка клеток

---

Перспективным представляется пятый способ получения ЭСК из бластоцист-партеногенонов, полученных без спермиев и оплодотворения. Такие зародыши имеют диплоидный набор хромосом матери за счет сохранения второго пронуклеуса. Методы лабораторной активации яйцеклеток к «беспорочному» зачатию позволяют получать

20-30% бластоцист от общего числа яйцеклеток, активированных 1,2-пропандиолом и ионофором Ca<sup>++</sup> (Gook D.A., Osborn S.M., Johnston W.I., 1995; Rhoton-Vissak A., Lo P.Y., Varud K.M. et al., 1996). ЭСК, полученные из партено-бластоцист, сохраняют нормальную потенцию для крупномасштабной наработки специализированных соматических клеток.. Ткани-партеноты обнаружены случайной биопсией у взрослых людей без признаков болезни или функциональных нарушений (Surani M.A., 1995).

В 2001 г команда израильских и американских биологов расшифровала первые software для параллельного получения специализированных клеток экто-, мезо- и эндодермы из общего пула ЭСК мыши.(Schuldinger R., Yanuka O., Itskovitz-Eldor I. Et al., 2000). В 2001 г опубликован метод получения бета- и альфа-клеток островков Лангерганса из НСК головного мозга мышей (Lumelsky N., Blondel O., McKey R. et al, 2001). В конце 2001 объявлено о создании 60 бессмертных линий ЭСК человека (19 – в университете Гетеборга, Швеция, 9 - в компании CyThera, San Diego, California; 7 - Reliance Life Science, Mumbai, India, 6 - Monash University, Melbourn, Australia, 5 - Wisconsin Alumni Res. Foundation, 5 – Karolinska Universitst, Stockholm, 4 - Technion Israel Institute, Haifa, Israel ; 3 - National Center of Biological Studies, Bangalor,India; 2 – Unversity of California, San Francisco, USA). После проверок только 25 линий ЭСК отвечали выбранным критериям. Отобранные линии ЭСК имели сходную морфологию и молекулярные маркеры клеток, пассировались более одного года без изменения фенотипа м кариотипа клеток, без признаков бактериальной или вирусной контаминации. В августе 2001 г мультимиллионер Джим Кларк, руководитель Silicon Graphic, инвестировал 150 млн долларов в Центр стволовой клетки при Стенфордском ун-те для расшифровки главных программ, управляющих поведением ЭСК.


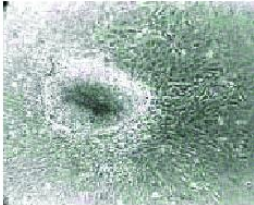
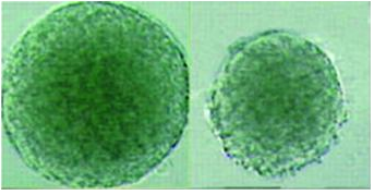

#### **4. Молекулярные основы тотипотентности генома ЭСК**

Геном зиготы и ЭСК находится в так называемой "нулевой точке", откуда стартуют две главные программы эмбриогенеза:

- 1) гастрюляция + органогенез
- 2) рестрикционное созревание дифференцированных клеточных линий.

Эти две программы задействуют примерно 5000 генов эмбриогенеза. Каким образом реализуется тотипотентность генома, т.е. способность выбирать одну из многих траекторий развития? Серийный анализ генной экспрессии (SAGE) в культуре ЭСК, мезенхимальной, нейрональной и гематогенной стволовой клетки выявил важнейшую закономерность (Kelli D.L., Rizzino A, 2000; Xiong J.W., Battaglino R., Leahy A. et al.,1998). Во всех перечисленных стволовых клетках присутствовали сходные наборы предсинтезированных мРНК следующих классов генов (Рис 1-8).

## Наборы мРНК, присутствующие в ЭСК , НСК и МСК

	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Зародышевые листки: Brachyury GATA-4, HNF-1, HNF-3 nodal, FGF-5, Oct-3</li> <li>2. Нох-гены: Нох-А, НохВ1, НохВ2, НохD, НохС GATA-2 GATA-4 GATA-3 Ноха3</li> <li>3. Тотипотентность и плюрипотентность: Otx-1, Otx-2 Sox-box (HMG): Sox1, Sox2, Sox3 Xdbx, Xash3, Zic1, Zic2, Zic3 SHH, Wnt-1, Wnt-3, noggin-antagonist BMP4</li> <li>4. Экспансия прогениторов: Ngn1, Ngn2, Ngn 3, Nkx 2.2, Nkx 6.1, Delta-Notch в наборе с Hes1, Hes2, Hes3, Hes4, Hes5 Pax-6, Pax3 EGF-R, bFGF-R, PDGF-R, IGF-1-R</li> <li>5. Анти-апоптоз: bFGF, SCF, EGF, ILGF-1</li> <li>6. Гены-контролеры: Mash-1, Math-1, NeuroD, MyoD, myf-5</li> <li>7. Миграция / навигация: reelin, VLDL-R, apoE-R нестин, виментин, N-cadherin, NCAM, Cadherin-11</li> </ol>	
<p>ЭСК</p>		
		
<p>НСК</p>		<p>МСК</p>

**Рис 1-8 Молекулярные основы тотипотентности стволовых клеток**

1) ранних генов экто-, мезо- и эндодермы



- 2) набор мРНК гомеотических (Hox) генов, контролирующих сегментацию и трехмерную карту зародыша
- 3) пять наборов мРНК генов тотипотентности. Каждый набор факторов тотипотентности увязан с комплементарным набором факторов и рецепторов пролиферации на прогениторных клетках в клоне. Особенно существенны спаренные блоки генов, контролирующие пролиферацию соседних слоев прогениторных клеток в клоне (типа Delta/Notch)
- 4) мРНК генов апоптоза, контролирующие численность прогениторных клеток в клоне. Баланс клеток достигается за счет миграции и частичной гибели клеток в клоне. Пролиферация постоянно уравнивается миграцией и апоптозом клеток.
- 5) набор мРНК контрольных генов (master genes) рестрикционного созревания специализированных клеточных линий (Terskykh A., Easterday M., Linheng L. et al., 2001)
- 6) наборы мРНК генов миграции и навигации миграторных клеток

Таким образом, в основе тотипотентности ЭСК, МСК и других стволовых клеток выявлен универсальный механизм: направленная активация и последующий импорт мРНК в ядро. Детали импорта/экспорта информации между ядром и цитоплазмой в ЭСК плохо изучены. Эта концепция тотипотентности подтверждается новыми наблюдениями, выполненными на одиночных клонах мезенхимальных стволовых клеток специальной техникой MICRO-SAGE. Микрометод верифицировал присутствие мРНК 1200 ключевых генов эмбриогенеза в одном клоне МСК (Tremain N., Korkko J., Iverson D. et al., 2001). Полученные данные поражают воображение. В клонах МСК из взрослой гематогенной ткани идентифицированы практически все наборы мРНК зародышевых листков, органогенеза, а также мРНК master-genes, контролирующих рестрикционное созревание линий мезенхимального, мезодермального происхождения, экто- и эндодермы. Клоны МСК по сути представляли собой библиотеки мРНК ранних этапов органогенеза и рестрикционного созревания специализированных линий. Если программы органогенеза обеспечивали направленный импорт мРНК в ядро для включения новых котранскриптаз, транскриптаз и транскрипционных комплексов, то рестрикционное

созревание клеточных линий связано с экспортом мРНК из ядра в цитоплазму с последующей модификацией белкового фенотипа прогениторных клеток. В каждом клоне перераспределение мРНК между ядром и цитоплазмой составляет ключевую часть перестройки soft-сети. Репрограммирование генома плюрипотентных клеток наиболее эффективно изучают средствами протеомики. Тотальная реорганизация белковых сетей ЭСК, составляющих платформу hard-|software, по-видимому, содержит ключи к разгадке эпигенетических процессов у истоков развития (Guo X., Ying W., Wan J. et al., 2001)

Мультипотентность МСК, выделенных из стромы гематогенной ткани взрослого человека, была верифицирована с помощью их трансплантации в пред- и постимплантационные зародыши овцы (Liechty K.W., MacKenzie T.C., Shaaban A.F. et al., 2000). Ростки трансплантированных МСК человека выявлялись как в плодах, новорожденных, так и в тканях животных через 1-1,5 лет после рождения. МСК человека преимущественно химеризовали хрящевую, жировую ткань, скелетные мышцы, сердце, строму гематогенной ткани и вилочковой железы. Часть донорских МСК накапливалась в виде перицитов в адвентиции артерий и мелких венул (Flake A.W., 2001). По-видимому, сосудистая циркуляция играет незаменимую роль в миграции и диссеминации МСК в зародыше. Циркулирующие в крови МСК выявлялись в зародышах человека до 15 нед развития (Compagnoli C., Fisk N., Tocci A. et al, 1999). МСК человека активно химеризовали зародыш овцы, если донорские клетки вводили в амниотическую полость. МСК человека легко преодолевали гематоэнцефалический барьер и детектировались в разных отделах мозга.

Особый интерес пересадки МСК привлекают в связи с проблемой иммунотолерантности реципиентов – химер. Особое внимание уделялась химеризации донорскими МСК стромы тимуса реципиента. Стромальные клетки используют для локального подавления иммунного ответа (на уровне антиген-презентирующих клеток). Наиболее яркий практический пример – это добавление клеток Сертоли в клеточный нейтрансплантат для блокирования иммунного отторжения (Willing A.E., Cameron D., Sanberg P.R., 1998).

Рост клонов ЭСК в культуре зависит от состава среды, набора факторов пролиферации. Важно, что рост клонов не контролируется факторами мезенхимы,

разобщен с работой Нох-генов и генов органогенеза, регулирующих численность клеток в растущем зародыше. Поэтому клоны ЭСК удается нелимитированно размножать *in vitro*, чего не бывает в самом зародыше.

## 5. Особенности фенотипа ЭСК

В отличие от специализированных клеток ЭСК сохраняли уникальную потенцию наборами мРНК «ранних» генов эмбриогенеза. Редакторуя мРНК, ЭСК обходятся без многих блоков транссигнализации, которые используют дифференцированные клетки. ЭСК для контакта с микроокружением используют минимальное число рецепторов, сигнальных белков, транскриптаз хроматина. Между тем наборы "housekeeping genes", обслуживающих потоки энергии, веществ, метаболизм экспрессированы на уровне дифференцированных клеток. Второй важнейшей характеристикой незрелых ЭСК в культуре является высокий потенциал пролиферации. На поверхности пролиферирующих ЭСК экспонирован уникальный общий рецептор для LIF, SCF, IL-6. Эта тройка сигналов через трансмембранную субъединицу GP-130 и соответственно Jak-Stat-3 транскрипционный комплекс процессирует сигналы в ядро, стимулируя вхождение G0 клеток в митоз. Схема событий между рецептором с ядром выглядят следующим образом. Высокоаффинное селективное связывание LIF, SCF, IL-6 с внешним рецептором активирует латентный фактор транскрипции Stat-3. Далее домен Stat-3 –SIE DNA binding –специфически взаимодействует с промотером c-fos на уровне ДНК хроматина (Рис 1-8). Примечательно, что активный Stat-3 не выявляли в эмбриобласте *in situ*. Активированный Stat-3 в комплексе с фактором тотипотентности Oct-4 запускал митозы и самообновление клонов ЭСК. Интенсивное самообновление ЭСК в культуре сопряжено с активацией тирозинфосфатазы SHP-2 Этот регуляторный фермент дефосфорилирует фосфотирозины разных белков (включая цитоплазматический сигнальный домен GP-130). Удаление фосфорных групп с

тирозинов вызывает стойкую активацию проводящей субъединицы GP-130. Активация GP-130 стимулирует следующую киназу ERK (extracellular regulated kinase). SHP-2- зависимая активация ERK необходима в качестве кофактора для устойчивого самообновления ЭСК *in vitro*. Сохранение тотипотентности пролиферирующих мышинных линий ЭСК связано с присутствием в этих клетках дополнительного регуляторного белка Gab-1 - кофактора экспрессии главного белка тотипотентности Oct-4.

Похоже, что белок Oct4 выполняет разные функции в ранних зародышах млекопитающих. Избыток Oct4 в эмбриобласте и ЭСК блокирует развитие клеток трофобласта, поддерживая тотипотентность пролиферирующих незрелых клеток. С началом органогенеза Oct4 контролирует начало рестрикционного созревания многих клеточных линий. Oct4 необратимо исчезает в созревающих клетках. В неактивном виде Oct-4 выявлен о зрелых ооцитах, зиготе и эпибласте. В фетусе Oct-4 выявляется в половом бугорке и примордиальных половых клетках. Если в ЭСК увеличить экспрессию Oct-4, клетки спонтанно дифференцируются в эндодерму и мезодерму. Оказалось, что Oct-4 активирует одни, ингибируя другие гены в зародышевых тканях.

Бластоцисты мыши Oct4<sup>-/-</sup> останавливаются в развитии после имплантации. Такие аномальные зародыши преимущественно содержат клетки трофобласта, тогда как клетки эмбриобласта подвергаются гибели (Nicols J., Zevnik B., Anastassiadis K. Et al., 1998). Однако клетки трофобласта также вяло пролиферируют, поскольку в зародышах отсутствует FGF4 (индуктором экспрессии гена FGF4 является Oct4). Все зародыши-гетерозиготы Oct4<sup>+/-</sup> проходят фазу имплантации без аномалий, поскольку 30-50% уровня Oct4 в эмбриобласте достаточно для его превращения в эпибласт и первичную полосу. Уровень Oct4 не влиял существенно на постимплантационную гибель зародышей.

Особую роль рецептор LIF/ GP-130 играет в задержке развития бластоцист у мышей, других грызунов на стадии диапаузы. Такие «законсервированные» на 3-4 нед бластоцисты, переживающие в полости матки, содержат зрелые клетки эпибласта вместо эмбриобласта. У зародышей с поврежденным GP-130 блокировано созревание эпибласта в диапаузных бластоцистах (Smith A.G., 2001)

Jak-Stat-3 "кабель" трансигнализации используется региональными гематогенными, мышечными стволовыми клетками для самообновления клеток клонов. LIF - рецептор ЭСК существенно влияет на выживание прогениторных клеток в культуре. Michel Revel из Вайсмановского института в Израиле показал, что прогениторные клетки в гематогенных клонках теряют способность формировать димерный вариант рецептора, который способен связывать IL-6. Такие клетки немедленно элиминируются из клонка апоптозом. Если стволовые клетки трансфицировать генетической конструкцией, содержащей ген лиганда IL-6 и ген GP-130 рецептора, то трансфицированным клонкам возвращается потенция к неограниченному самообновления с минимальным апоптозом. Такие клоны долгосрочно обновлялись *in vitro* и *in vivo* (Kollet O., Aviram R., Chebat J. et al., 1999).

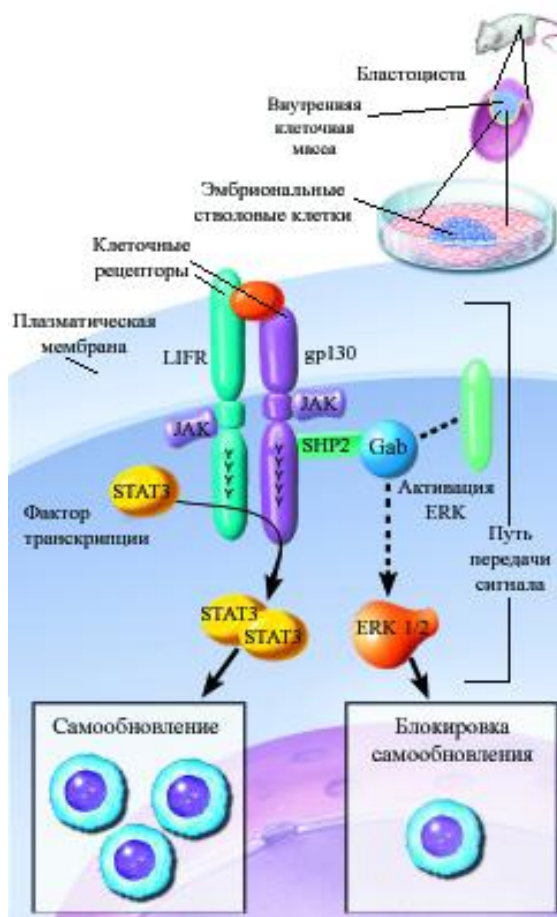


Рис 1-9. Система сигнализации LIF-рецептора в клеточное ядро

На следующем этапе прогениторные клетки пролиферируют под контролем спаренных рецепторов Delta/Notch в комплексе с фактором тотипотентности- продукта семейства генов *Hes* (*Hes7* в клонах мезодермы, сомитах и клонах миогенных стволовых клеток скелетных мышц). В клонах стволовых клетках ЦНС экспрессирована пара *Hes1*, *Hes5*, тогда как один *Hes5* экспрессирован в клетках-предшественницах олигодендроцитов.

"Минимальный фенотип" ЭСК и примордиальных половых клеток (ППК) проявлялся ошаренной формой клеток из-за отсутствия цитоскелета, белков и рецепторов адгезии на поверхности плазматической мембраны, а также многих кофакторов сигнализации, вмонтированных в компоненты цитоскелета. ЭСК и ППК имели высокую активность теломеразы и щелочной фосфатазы. В отличие от региональных стволовых клеток ППК не имели на поверхности бета1-интегрин. ППК вступают в дифференцировку, формируя вторичные агрегаты клеток в суспензии (эмбрионидные тельца).

В последние годы бессмертные тотипотентные линии ЭСК были выделены из эмбрионов крыс, коровы, приматов, свиней. Показательно, что все ЭСК имели не только близкое строение, но и практически универсальный набор антигенов-маркеров, (SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-81, TRA-1-60). (Таблица 2)

<b>Таблица 2. Сравнительные характеристики фенотипа ЭСК разных видов</b>					
Название маркера	ЭСК/ППК/ТК Мыши	ЭСК приматов	ЭСК человека	ППК человека	ТК человека
SSEA-1	+	-	-	+	-
SSEA-3	-	+	+	+	+
SEA-4	-	+	+	+	+
TRA-1-60	-	+	+	+	+
TRA-1-81	-	+	+	+	+
Щелочная фосфатаза	+	+	+	+	+
Ost-4	+	+	+	Данные отсутствуют	+
Высокая активность теломеразы	+ ЭСК, ТК	Данные отсутствуют	+	Данные отсутствуют	+
Зависимость от фидера	ЭСК, ППК, некоторые ТК	Имеется	Имеется	Имеется	Небольшая, низкая клоногенность
Факторы, способствующие самообновлению стволовых клеток	LIF и другие факторы, действующие через gp130- рецептор, способны замещать фидер	Сокультивирование с фидерными клетками; другие факторы не выявлены	Фидерные клетки + сыворотка; фидер + бессывороточная среда + bFGF	LIF, bFGF, форсколин	Факторы не выявлены, утеря тотипотентности в пассажах
Характеристики роста in vitro	Округлой формы, многослойные агрегаты ЭТ	Агрегаты ЭТ уплощённой формы	Агрегаты ЭТ уплощённой формы	Округлой формы, многослойные агрегаты ЭТ	Агрегаты ЭТ уплощённой формы
Формирование тератом in vivo	+	+	+	-	+
Образование химер	+	Данные отсутствуют	+	-	+

Внешние домены этих "метчиков" представлены комплексом гликолипида GL7 с сиаловой кислотой. Фенотипические характеристики ЭСК и ППК не менялись после 20-30 пассажей. Культура продолжала расти плотными суспензионными клонами, в которых клетки удерживались плотными межклеточными контактами, резистентными к трипсину (рис 1-4 г-д).

#### **6. ЭСК – модель для изучения геномики раннего эмбриогенеза и органогенеза**

С помощью ЭСК удалось выяснить первые гены, либо комбинации генов, реализующие трехмерную карту зародыша, а также коды линейного созревания клеток-предшественниц в зрелые функциональные единицы органов (дольки печени, альвеолы легкого, нефроны почек). Развитие зародышей с выключенной гамма-субъединицей ламинина LAMC1<sup>-/-</sup> останавливается на стадии формирования экстраэмбриональной энтодермы из-за дефекта миграции клеток (Smyth N., Vatansever S.H., Murray P. et al., 1999). Нокаут гена Brachyury или zeta-globin вызывал раннюю гибель зародышей из-за блока развития мезодермы. Выключение гена GATA-4 останавливало развитие энтодермы. Вторым master-gene энтодермы оказалась транскриптаза vHNF-1 (variant Hepatocyte Nuclear Factor 1), которая на следующем этапе активировала следующее семейство генов: HNF-4alpha1, HNF-1alpha, HNF-3gamma. Третьим master-gene энтодермы оказался ген cas (casanova). Выключение этого гена блокировало развитие всей энтодермы зародышей.



Таблица. Маркеры зародышевых листков в культуре эмбриональных телец

Маркер	День культивирования										Экспрессия in vivo
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
oct-3	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	·Эмбриональная эктодерма 0.5-8.5 (Rosner et al., '90; Scholer et al.'90);
FGF-5	+	++	++	++	++	++	+	+	+	+	·Эмбриональная эктодерма и дистальный embryo proper 5.25-7.7
GATA-4	+	+	+	+	+	++	+	++	++	++	·Primitive endoderm visceral and parietal endoderm Endodermal derivatives endocardium, card, gonade. 5.0 – adult
nodal	-	+	+	++	++	++	+	++	+	+	·embryonic ectoderm, primitive endoderm, and anterior primitive strik 6.25-7.5
Brachyury	-	-	++	++	++	++	+	+	+	+	·Mesoderm and notacord, 6.5-8.5
flk-1	-	-	++	++	++	++	+	++	++	+	·Vascular, 7.0-adult
Nkx-2.5	-	-	-	-	-	++	+	++	++	++	·Cardiogenic mesoderm, 7.5- adult
EKLF	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++	·Blood cells of yolk sac Primordia 7.5-adult
Msx3	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++	·Neural tube, 8.5-16.5
Стадии развития ЭТ эквивалентны:	Постимплантация -----> Гастрюляция -----> Ранний органогенез ----->										

Из табличных данных следует важный вывод: временной порядок включения ключевых транскриптаз совпадает в постимплантационных зародышах и в культуре эмбрионидных телец (вторичных агрегатов ЭСК) (Leahy A., Xiong J.W., Kuhnert F. Et al., 1999). Порядок включения важнейших генов постимплантационного периода существенно не зависит от факторов микроокружения.

Зародыши мыши GATA3<sup>-/-</sup> погибали на 11-12 день гестации от блока гематоэза в фетальной печени. Зародыши мыши SCL<sup>-/-</sup> погибали на 9.5 день из-за блока желточного кроветворения. Зародыши Flt<sup>-/-</sup>, как и зародыши Flk<sup>-/-</sup> погибали вскоре

после имплантации из-за дефектов васкулогенеза и капиллярогенеза. Без этих рецепторов ангиобласты подвергались ошибочной сборке. В результате возникали фатальные аномалии в желточном мешке. Если мутация Flk-/- наиболее сильно поражала зародыш (где сосредоточено максимальное число этих рецепторов), то мутация Flt-/- преимущественно блокировала развитие желточного мешка. Если в нокаут-зародыши своевременно пересаживали нормальные ЭСК, дефект развития устранялся. С помощью донорских клеток удавалось ликвидировать внутриутробную аномалию развития в зародышах-химерах.

Зародыши мыши FGF4-/- останавливались в развитии и погибали сразу после имплантации из-за блока развития клеток трофэктодермы (Nishimoto M., Fukushima A., Okuda A.,1999). Техника нокаут-генов позволила выяснить детали образования транскрипционного комплекса Oct4 / Sox-2. Синергистическая активация/репрессия Oct4/Sox-2 осуществляется с помощью третьего гена –UTF1 (Nishimoto M., Fukushima A., Okuda A.,1999). Показано, что для любых линий ЭСК in vitro характерна синхронная активация 5 факторов транскрипции: Oct4, Oct6, Sox-2, PEA3 и REX-1. С началом вступления незрелых пролиферирующих ЭСК в дифференцировку экспрессия 5 факторов транскрипции более или менее синхронно угасает. Экспрессия UTF1 находится под синергистическим контролем генов Oct4/Sox-2. В свою очередь активный белковый комплекс транскриптаз Oct4/Sox-2 активирует третий ген - FGF4. По-видимому, комплекс Oct4/Sox-2 контролирует также экспрессию следующих ранних генов в ЭСК: osteopontin adhesion molecule (Opn), коактиватор транскрипции UTF1, фактор транскрипции REX-1 (Du Z., Cong H., Zhen Y.,2001). В ряде линий ЭСК этот генетический «конвейер» поддержания плюрипотентности клеток нарушается при пассировании. Экспрессия вышеупомянутых факторов транскрипции существенна для оценки качества ЭСК, поступающих из клеточных банков.

Выключение генов nodal, FGF-5, Oct3 останавливало развитие нейроэктодермы и нервной пластинки. Ген Nkx-2-5, CSX избирательно контролировал закладку кардиогенной мезодермы, Msx3 - закладку нейральной трубки, EKLF - закладку желточного кроветворения (Репин, 2001). Техникой нокаут был идентифицирован SIP ген, ответственный за парное симметричное формирование зачатков органов. На мутантных мышах открыто новое семейство генов Taube Nuss, контролирующих

уровень апоптоза клеток у зародышей на стадии органогенеза. Эти гены особенно важны для элиминации провизорных клонов и органов (Voss A.K., Thomas T., Petrou P. et al., 2000). Расшифрованы функции семейства сигнальных белков STAT (signal transducer and activator of transcription) в ЭСК мышей. STAT1 обеспечивает сигнализацию между рецепторами интерферона и хроматином. Выключение STAT1 элиминировало все клоны зародышей, экспонирующие рецепторы для интерферона. Зародыши STAT4<sup>-/-</sup> и STAT6<sup>-/-</sup> развивали летальные дефекты созревания тимоцитов. Зародыши STAT3<sup>-/-</sup> погибали внутриутробно на стадии раннего органогенеза. Зародыши STAT5a<sup>-/-</sup> имели внутриутробные аномалии развития молочной железы (Akira S., 1999). У зародышей SF-1<sup>-/-</sup> нарушалась закладка надпочечников и половых зачатков. У зародышей Wt-1<sup>-/-</sup> нарушалась закладка и развитие почек. Этим же способом, показано что выключение Нох-1 гена частично блокирует гематопоз в зародышах. Выключение Нох-7, Нох-8 генов вызывает аномалии развития миоцитов.

После имплантации, клетки эмбриобласта дифференцируются в экстраэмбриональную энтодерму и эмбриональную эктодерму. Эмбриологи искали способы моделирования этих событий *in vitro*. Если из среды убрать фидер и LIF, пролиферация клонов приостанавливалась. ЭСК формировали агрегаты (эмбрионидные тельца). В части агрегатов шла дифференцировка клеток, которая в обратном порядке по отношению к зародышу включала маркерные гены трех зародышевых листков. Наружний слой маркировал экстраэмбриональную энтодерму геном GATA-4, тогда как внутренний слой - в эктодерму маркерным геном *nodal* (Xiong J.W., Battaglini R., Leahy A. et al., 1999). Одновременно в клеточных агрегатах убывала экспрессия гена *Ost-4*. Несколько лабораторий научились эффективно контролировать дифференцировку клеточных агрегатов (эмбрионидных телец) после экспрессии генов трех зародышевых листков (Schambloott M.J., Axelman J., Littlefield J.W., et al., 2001). Задача заключалась в направленном получении клеток одного зародышевого листка из эмбрионидных телец. С этой целью научились включать гены гастрюляции и органогенеза в эмбрионидных тельцах в более медленном темпе (Leahy A., Xiong J.W., Kuhnert F., J. Exp. Zool., 1999). Включение генов органогенеза автоматически вело к утрате туморигенности постмитотическими клетками эмбрионидных агрегатов. Более того, трансплантационная выживаемость и активная колонизация такой

плюрипотентной ткани в организме реципиента была выше, по сравнению с исходными ЭСК. Пересадки тотипотентной зародышевой ткани на стадии экспрессии первых генов зародышевых листков вытеснят в недалеком будущем пересадки клеточных линий стволовых клеток из-за более высокой эффективности колонизации, приживления, плюрипотентности ростков. По мнению Герхардта, плюрипотентная зародышевая ткань сохраняла синергизм взаимодействия клонов, который необходим для выращивания полноценного трансплантата. Такая плюрипотентная ткань незаменима для моделирования и изучения процессов гаструляции, а также взаимодействия мезенхимы с гомогенной эктодермой или мезодермой *in vitro*. Напомним, что потенции линий ЭСК человека в генерации дифференцированных клеток пока не стоит преувеличивать. Например, только 8 % эмбрионидных теллец удается *in vitro* превратить в островки сокращающихся кардиомиоцитов (у ЭСК мышей эта способность к моно-дифференцировке – на порядок выше) (Kehat I., Kenyagin-Karsenti D., Snir M. Et al., 2001). При этом образующиеся в культуре кардиомиоциты имеют незрелую ультраструктуру саркомеров и дисков. Между тем многие биотехнологические компании, владеющие первыми линиями ЭСК человека, уже делают широковещательные заявления о том, что линии ЭСК человека должны стать единственным мостом в будущее (игнорируя неограниченные геномные возможности природных фетальных тканей).

С помощью ЭСК апо-E3-/- удалось вывести линию мышей с высокой предрасположенностью к атерогенному атеросклерозу. У этих животных в постнатальном периоде развивалась гиперхолестеринемия и исчезала природная резистентность к стенозирующим бляшкам. Эти мыши сейчас широко используются для тестирования новых гиполипидемических и антиатерогенных препаратов.

Как известно, первичные сигналы, формирующие 3D-оси зародыша после имплантации, возникают на стыке экстраэмбриональной энтодермы, висцеральной энтодермы и эмбриональной эктодермы. Лишь часть этой программы фрагментарно воспроизводится в культуре эмбрионидных теллец. (Knezevic V., Mackem S., 2001).

Если ЭСК выделять из эмбриобласта бластоцисты, первыми возникали эмбрионидные агрегаты с маркерами энтодермы в виде фрагментов желточного мешка. Прimitивная висцеральная энтодерма образуется из мигрирующих клеток

эмбриобласта. Позднее многие клетки эпибласта мигрируют в париетальную энтодерму и в клетки желточного мешка. Далее из части желточной энтодермы шло формирование первичных ангиобластов и капиллярогенез. Поэтому примесь энтодермы и эндотелиальных клеток удаляли перед повторным пипетированием клонов для получения тотипотентных ЭСК. Попытки выделить ЭСК из трофобласта закончились неудачей (возможно из-за наличия в сыворотке бактериальных эндотоксинов). Однако популяцию гигантских клеток трофобласта получают путем трансфекции бластомеров мыши геном Hand1 и его сверхэкспрессии в клетках, которые дифференцируются в трофэктодерму (Fan Y., Melhem M., Chaillet R., 1999). Даже следовые концентрации эндотоксина в среде культивирования вызывали массовую гибель незрелых стволовых клеток. Впрочем получить клетки трофобласта из ЭСК человека или приматов удавалось (Odorico J.S., Kaufman D.S., Thomson J.A., 2001). Недавние исследования израильско-американских биологов выявили комбинации из 8 ростовых факторов, которые направляли дифференцировку эмбрионидных телец в сторону экто-, мезо- или энтодермы. Так, активин в сочетании с TGF-beta предпочтительно стимулировал развитие мезодермы, тогда как комбинация ретиноевой кислоты, bFGF, EGF, BMP-4 стимулировали одновременное развитие экто- и мезодермы. Возникновение энтодермы в культуре не шло без добавления HGF и NGF.

## **7. Направленная дифференцировка ЭСК и ППК *in vitro***

Ранее всего спонтанная дифференцировка ЭСК была изучена в культуре тератокарциномы. Недостаток линий ТК в том, что они быстро теряли способность дифференцироваться в стандартно воспроизводимые фенотипы соматических клеток. Первой была описана дифференцировка эмбриокарцином в крупные распластанные клетки (в культуре с низкой плотностью клеток). Часть полиплоидных клеток синтезировала хорионический гонадотропин, что делало фенотип похожим на клетки трофобласта. Далее была найдена линия NTERA2, на которой удалось детально изучить нейрогенез под влиянием ретиноевой кислоты. Этот проект закончился

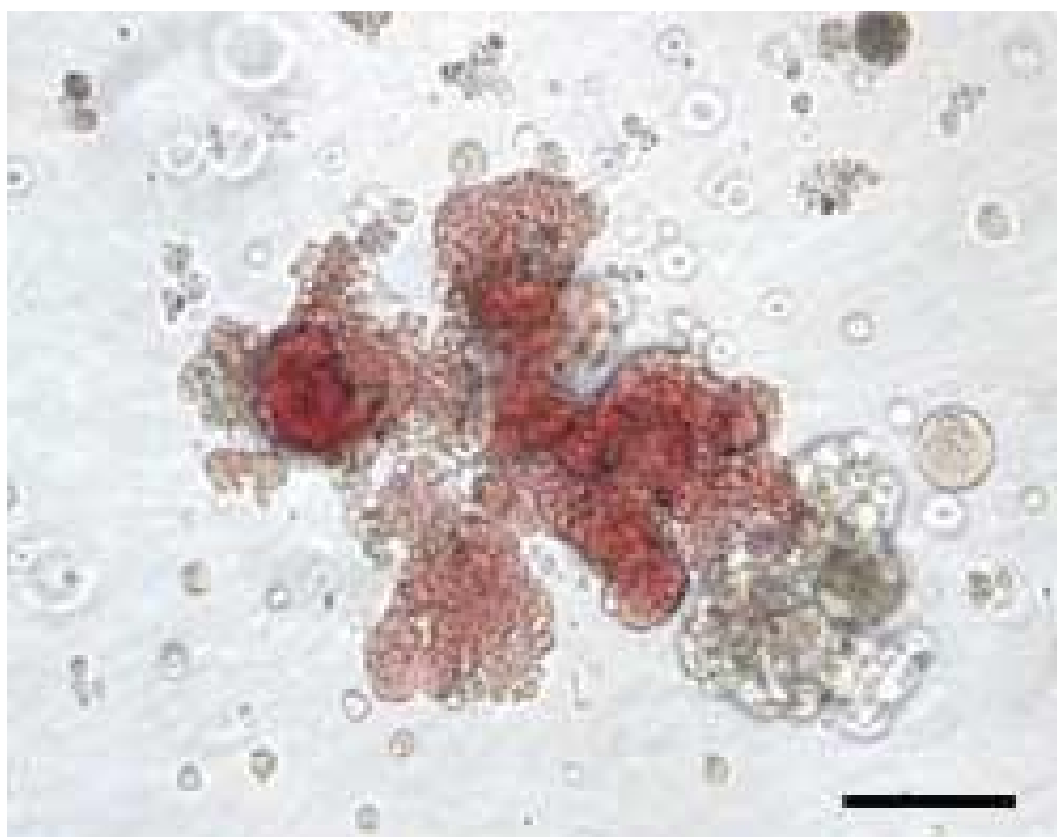
первым в истории биологии получением лабораторных нейронов и их дальнейшим использованием в клинике для лечения последствий инсульта, травм спинного и головного мозга, а также нейродегенеративных заболеваний. (подробности см. [www.biolayton.com](http://www.biolayton.com)).

Первые итоги лабораторного получения дифференцированных клеток из ЭСК были резюмированы в 1996 г (Weiss M., Orkin S.D., 1996). Инкубация клеток тератокарциномы F9 или P19 с тщательно подобранной концентрацией цАМФ и ретиноевой кислоты вызывала индукцию висцеральной энтодермы (желточного мешка). Клетки этого зачатка в культуре синтезировали фетуин, альфа-фетопротеин и альбумин. Те же клетки тератокарциномы созревали в гематогенные линии при добавления IL-3 и супернатанта фидера от стромальных клеток. Полагали, что фидер продуцировал следующие сигналы для созревания гематогенных линий: IL-3, SCF, bFGF, IGF-1, IL-6, GCSF.

Репертуар дифференцировки линий ЭСК Томсона в соматические клетки *in situ* богаче, чем лабораторная дифференцировка ЭСК тератокарциномы (Odorico J.S., Kaufman D.S., Thomson J.A., 2001). Выращенные в плотной культуре ЭСК человека (особенно при редкой смене фидера) снижали темп пролиферации и начинали спонтанно дифференцироваться. Сохранение плюрипотентности связано с поддержанием синтеза ID – ингибиторов дифференцировки (Nogueira M.M., Mitjavila-Garcia M.T., LePasteur F. et al., 2000). Первыми в таких «стареющих» культурах появлялись клетки экстраэмбриональной энтодермы, а также экспрессировались гены зародышевых листков (Reubinoff V.M., Pera M.F., Fong C. et al., 2000).

Кроветворение *in vitro* в клоногенной культуре ЭСК начиналось при соблюдении двух условий: 1) из среды культивирования убирали LIF 2) создавали контакт эмбрионидных телец с клетками стромального фидера. В необработанных культурах кроветворение сочеталось с васкулогенезом. Внутри эмбрионидных телец воспроизводились события, происходящие в желточном мешке: формировалась сеть ангиобластов с островками первичного кроветворения. Только крупные ангиобласты формировали капилляры *de novo* (васкулогенез). Позднее капиллярная сеть росла лишь за счет краевого роста (*sprouting*) эндотелиальных клеток. В культуре ЭСК удалось наблюдать отдельно образование капилляров и островков кроветворения.

Большинство гематогенных стволовых клонов, полученных из ЭСК, не имели клинической перспективы, поскольку имели укороченные сроки обновления *in situ*. Сокультивирование «лабораторных» гематогенных колоний с гематогенной стромой возвращало потенцию клонам как к длительному самообновлению *in viro*, так и длительному выживанию в гематогенной ткани реципиента (Wang S., Gaerhart J.D., 2000).



**Рис 1-10** Образование гематогенных клонов из эмбрионных тельц ЭСК мыши

Для получения гематогенных стволовых клеток эмбрионные тельца механически дезагрегировали в однородную клеточную популяцию. Затем клетки культивировали методом "висячей капли", либо помещали на метилцеллюлозу с добавлением цитокинов и ростовых гематогенных факторов. Показано, что ЭСК, трансфицированные двойной дозой гена Нох-В4, троекратно увеличивали скорость наработки предшественников миелоидного и эритроидного ряда *in vitro*.

Обращало внимание, что синхронное образование предшественников кроветворения и эндотелия *in vitro* происходило не через мезенхиму и мезенхимальные стволовые клетки (как это происходило *in situ*). В зародыше взаимодействие стромы и гематогенных стволовых клеток предопределяло образование полноценной кроветворной ткани с длительно живущими самообновляемыми ростками миело- и эритропоэза. Возникновение очагов кроветворения из ЭСК сопровождалось частичной дифференцировкой островков кроветворения в линии так называемых эмбриональных макрофагов. Линии макрофагов, возникающих из кроветворных клонов желточного мешка имели фенотипические особенности. Эти клетки не принимали участия в презентации антигенов, но обеспечивали удаление погибающих клеток из провизорных клонов. После рождения такие транзиторные линии макрофагов полностью исчезали из кроветворной ткани (Inamdar M., Roch T., Rapoport R. et al., 1997). Продемонстрирована дифференцировка клонов ЭСК мышей на специальном фидере без нескольких ростовых факторов, блокирующих эритропоэз и миелопоэз, в гетерогенную популяцию пре-B-лимфоцитов с характерными маркерами созревания (CD 19, CD24, CD117, CD45R+). С помощью рекомбиназы клетки на поверхности собирают иммуноглобулины из мРНК V,D, и J локусов. Индуктором дифференцировки являлся лиганд рецептора Fcγ3 (Cho S.K., Webber T.D., Carlyle J. et al., 1999)

Для индукции нейрогенеза из ЭСК *in vitro* из среды убирала LIF и фидер. Далее частично прикрепленные к подложке постмитотические клетки обрабатывали 100нмоль ретиноевой кислоты с добавкой 1% телячей сыворотки (FCS). Эффективность начальных этапов нейрогенеза контролировали по экспрессии мРНК двух генов: Pax-6 и SHH. Исчезновение мРНК гена SHH коррелировало с остановкой митозов прогениторных популяций. Включение гена Pax-6 маркировало начало рестрикционного созревания нейронов.

Линия тератокарциномы человека NT2 генерировала более 80% постмитотических нейронов после добавления в культуральную среду 10 мкг/мл ретиноевой кислоты в течение 6 нед (пропись фирмы BioLayton). Однако такой выход нейронов удавалось получить только из культуры, в которой сперва отсортировывались нестин+ НСК. Если получали нейроны из общей массы предшественников, эффективность



процедуры оставалась на уровне 10-30 %. С помощью иммунофенотипических маркеров однородную популяцию зрелых постмитотических нейронов высортировывали с помощью поточного сортировщика клеток от остатков незрелых клеток. Как показали многократные эксперименты на животных, такие нейроны после трансплантации в мозг не только выживали, но и встраивались в региональные нейронные сети. В экспериментах на животных с модельным дефектом ЦНС обнаружены позитивные эффекты нейротрансплантата на симптоматику заболевания (последствия травмы, инсульта, демиелинизирующие заболевания, наследственные дефекты развития мозжечка, болезни отложения липидов и полисахаридов и т.п.). Эти вопросы подробно рассмотрены во второй главе книги.

Пока лишь фрагменты программ для направленной дифференцировки ЭСК человека *in vitro* попали в открытую печать. Установлено, что нейрогенные эффекты ретиноевой кислоты *in vitro* нужно оценивать по экспрессии гена Wnt-13. Сама ретиноевая кислота стимулировала образование функционально незрелых нейронов с недоразвитой сетью синапсов и без электровозбудимой мембраны. Прединкубация таких незрелых нейробластов с средой культивирования зрелых астроцитов завершала дифференцировку тел нейронов и их медиаторную специализацию. Хотя лабораторно полученные нейроны человека из ЭСК уже начали использоваться в клинических испытаниях, научная база рестрикционного созревания ЭСК в нейроны только формируется. Детали "software" для лабораторного нейрогенеза строго засекречены и приватизированы частными фирмами. По-видимому, от идеи «один сигнал - один фенотип» приходится отказаться. Рестрикционное созревание любой соматической линии клеток находится под контролем множества сигналов.

В культуре НСК из фетального мозга добавление 0,5 мкмоль ретиноевой кислоты в три раза усиливало скорость созревания нейронов (в контроле среда содержала только bFGF). Если ретиноевая кислота ускоряла индукцию master-genes (NeuroD, Hu, NeuN, p21), то нейротрофины (BDNF, NT-3, NGF) завершали второй этап дифференцировки нейронов формированием "профиля" нейромедиаторов. BMP-2 и BMP-4 необходимы для терминальной специализации нейронов. Показательно, что дифференцировка ЭСК в нейроны *in vitro* шла иными путями, чем созревание нейронов *in situ*.

Общепризнанно, что в зародыше все популяции нейронов и глии образуются из нейральных стволовых клеток (НСК), первично возникших в эпендиме/субэпендиме развивающейся нервной трубки. Все НСК возникают в ходе гаструляции из клеток первичной эмбриональной эктодермы, получающей индуктивные сигналы от организатора (мезоэнтодермы) (Tropepe V., Niftoshi S., Sirard C. et al., 2001). НСК в нервной трубке отличаются характерными маркерами: polysyalated-NCAM - поверхностный маркер незрелого нейроэпителлия; нестин, виментин - белки промежуточных волокон нейроэпителлия. Другой ранний белок- glial fibrillar acidic protein (GFAP) – преимущественно метит субэпендимальные НСК, особенно латерального желудочка мозга (Alvarez-Buyilla, 2000). За последние годы стало ясно, что НСК можно получать из ЭСК альтернативным путем, не повторяя событий *in situ*.

Получить редкие колонии НСК в плотной культуре ЭСК удалось остановкой пролиферации в бессывороточной среде с добавлением 1мкмоля ретиноевой кислоты. Через 1 нед появлялись типичные нейросферы, клетки которых окрашивались антителами к нестину, виментину и polysyalated-NCAM. Еще через 1 нед в нейросферах появлялись клетки, экспрессирующие мРНК гена Рах-6. Когда позже сферы прикреплялись к подложке, распластаные вытянутые клетки формировали отростки и были идентифицированы как нейробласты с помощью антител к MAP-2, NeuN, betaIII-tubulin. На заключительных стадиях созревания формировались лиганд- и потенциал-зависимые ионные каналы, рецепторы и белки синаптической мембраны. Получены однородные популяции предшественников олигодендроцитов из ЭСК. Трансплантация лабораторно полученных предшественников олигодендроглии стимулировала ремиелинизацию в поврежденном мозге животных (Brustle O, Jones K, Lerish R, et al., 1999; Liu S., Qu Y., Stewart T.J. et al., 2000).

Серийный анализ геной экспрессии (SAGE) выявил наиболее важные сдвиги экспрессии генов (активация или выключение синтеза мРНК) в трех отсеках генома: энергетика, метаболизм и сигнализация. В незрелых пролиферирующих ЭСК отмечена ограниченная экспрессия генов сигнализации (рецепторы, G-белки, вторичные мессенжеры, транскриптазы, кофакторы экспрессии и репрессии). Из 588 исследованных генов сигнализации в ЭСК менее половины оказались экспрессированными. Методом SAGE показано, что при начальной индукции

нейрогенеза ретиноевой кислотой происходило синхронное выключение 18 "старых" генов, работающих в ЭСК. Одновременно, включались 61 новых генов "сигнализации". Учитывались самые мощные сдвиги экспрессии, когда уровень мРНК возрастал или снижался в 2.5 раза и более. Первыми в ЭСК включались гены, контролирующие рецепторы клеточной адгезии, компоненты экстрацеллюлярного матрикса, рестрикционные транскриптазы и компоненты «кабеля транссигнализации» между ядром и рецепторами. Выключению подвергались гены-сайленсеры и коингибиторы генной экспрессии, удерживающие геном в неактивном, либо тотипотентном состоянии (Kelly, Rizzino, 2000)

В ранних работах спонтанно сокращающиеся кардиомиоциты получали из ЭСК мышинных тератокарцином путем добавления в среду культивирования диметилсульфоксида (ДМСО). Позднее стало известно, что ДМСО играет роль вектора для доставки гидрофобных сигналов (ретиноевая кислота, цитокины с гидрофобными доменами) в ядро стволовых клеток. Более эффективно кардиомиоциты получают сейчас под контролем экспрессии гена *Crypto*. Уже говорилось, что этот ген контролирует нормальное формирование *founder cells* в эпибласте. Линии ЭСК *Crypto*/- теряли способность генерировать зачаток сердца. Накопление кислородных радикалов и электрическая стимуляция ЭСК в культуре ускоряли образование зрелых спонтанно сокращающихся кардиомиоцитов. Такие кардиомиоциты, полученные в лаборатории, активно встраивались в миокард развивающихся зародышей, либо в постишемическую поврежденную ткань (Doevendans P.A., Kubalak S.W., An R.H. et al, 2000; Kehat I. et al., 2001 ).

Многие специализированные линии клеток (адипоциты, клетки поджелудочной железы, островки Лангерганса, клетки эндокринных желез, иммунной системы) не возникали спонтанно из ЭСК при блокаде клеточной пролиферации. Большинство исследователей получали адипоциты из линий стромальных клеток мезодермального происхождения (типа 10T1/2) (Dani C., Smith A.G., Dessolin S., et al, 1997).

Только некоторые линии ЭСК тератокарциномы (E14TG2a, CGR8, ZIN40) трансформировались в адипоциты при добавлении ретиноевой кислоты, растворенной в ДМСО. Если микромолярные концентрации ретиноевой кислоты ингибировали адипогенез, то наномолярные концентрации ретиноевой кислоты были эффективными

индукторами жировых клеток (до 30-60 % от всех клеток в культуре). Предполагают, что ретиноевая кислота вызывает образование мультипотентных мезенхимальных клонов в культуре, которые далее по разным программам повторяют адипогенез, миогенез, кардиогенез уже с помощью набора сигналов и генов «второго эшелона» Низкие «адипогенные» концентрации ретиноевой кислоты не влияли на экспрессию генов *Brachyury*, *Zeta-globin*, *Nkx5-2*, кардиоспецифичную изоформу актина. Наоборот, высокие «кардиогенные» концентрации ретиноевой кислоты, блокируя адипогенез, стимулировали экспрессию генов мезодермы, кардиогенной мезодермы, генов созревания кардиомиоцитов (Dani C., Smith A.G., Dessolin S. et al., 1997) .Для этой трансформации существовал узкий временной диапазон (критический период), когда не только витамин А, но и стимуляторы пероксисом, ТЗ (трийодтиронин) и индукторы липогенеза ускоряли образование преадипоцитов в культуре. Фенотип преадипоцитов определяли по появлению транспортных белков для жирных кислот и синтезу триглицеридов.

Как известно, хондроциты в ходе эмбриогенеза образуются из сомитов и мезодермы через множество промежуточных структур костно-мышечной системы. Источником хряща являются мезенхимальные стволовые клетки. Однако с помощью ЭСК удалось воспроизвести рестрикционное созревание хондроцитов в обход главных событий органогенеза, взаимодействий склеротомов и нотохорды, не повторяя сложных эпителиомезенхимальных взаимодействий. Кажется удивительным, что эмбрионидные агрегаты ЭСК в простых условиях культуры способны дифференцироваться в хондроциты вне формирования зачатка конечности и других провизорных структур зародыша. ЭСК наращивали стандартным методом в суспензии над фидером в среде Дульбекко-Игл с 15% FSC (HyClone). Выращенные агрегаты переносили на малтивеллы с дном, покрытым желатиной, и клетки переносили в среду для дифференцировки. Главными сигналами хондрогенеза было сочетание концентраций BMP-2, BMP-4 и TGF-beta. Исследование спектров мРНК показало, что первый этап дифференцировки сопровождается активацией генов *Sox-9*, *Rax-1* – маркеров мезенхимальных стволовых клеток. На втором этапе активировалась транскриптаза *scleraxisi* и начинался синтез коллагена II типа. Третий этап созревания оценивали по накоплению специфического протеогликана- агрекана (Kramer J., Hegert C., Guan K. et

al., 2000). Самая важная особенность хондроцитов, полученных из ЭСК, - их уникальная способность сохранять фенотип дифференцированных клеток при длительном культивировании. Как известно, хондроциты в первичной культуре, выделенной из фетального или взрослого хряща, дедифференцируются в фибробласты за 7-15 дней. Возможно, эта особенность лабораторно полученных хондроцитов найдет практическое применение в медицине.

В заключение следует подчеркнуть, что лабораторное получение нейронов, кардиомиоцитов и других соматических клеток человека из ЭСК идет в обход важнейших событий эмбриогенеза: 1) взаимодействия мезенхимы с провизорными клонами и тканями трех зародышевых листков 2) в обход региональных программ рестрикционного созревания нейронов и глии, когда источником локальных сигналов служила мезенхима. Полную картину ранних стадий эмбриогенеза невозможно воспроизвести на изолированных линиях ЭСК без организованного роста мезенхимы и провизорных органов. Например, из линий ЭСК не удастся получить клетки нервного гребня *in vitro*. Лишь часть ранних событий органогенеза воспроизводится хаотически в культуре «эмбрионидных телец». Поскольку созревание линий дифференцированных клеток изначально идет в простых средах, полученные нейроны, кардиомиоциты, хондроциты способны стабильно сохранять фенотип в лабораторных условиях. Между тем добиться длительного сохранения фенотипа тех же клеток в культуре, изолированных из органов взрослых животных млекопитающих и человека, часто оказывается невозможным. Трансплантация лабораторно полученных нейронов/нейробластов в организм животных, подтверждает их функциональную полноценность, в том числе как средства биорепарации повреждений *in situ*. Существенно, что рестрикционное созревание нейронов, гепатоцитов, кардиомиоцитов может идти в культуре «отдельным пакетом» вне морфогенеза и общих программ согласованного строительства зародыша. Более того, часть программ «линейного созревания» клеток идет только *in vitro* после дисперсии клеток-предшественников и устранения межклеточных взаимодействий, которые блокируют дифференцировку прогениторных популяций. Например, многие программы дифференцировки клеток блокированы в «эмбрионидных тельцах», но идут после дезагрегации клеток.

Дифференцировка ЭСК в специализированные классы соматических клеток открывает беспрецедентные возможности для изучения функциональных программ генома. Предстоит понять, почему в лабораторных условиях существуют десятки способов получения функционально зрелых нейронов или кардиомиоцитов с помощью разных сигналов и генов (Wernig M., Brustle O., 2002). Возможно, что разные способы сборки молекулярных машин и транскрипционных комплексов ведут к неидентичному функциональному результату, т.е. не жестко запрограммированному ответу клеток.

### **8. ЭСК в изучении функций Нох-генов**

Как уже упоминалось, некоторые линии ЭСК и ТК мышей характеризовались высокой частотой хромосомных перестроек, иногда анеуплоидией, которые попутно заканчивались образованием immortalized линий. Взаимосвязь между immortalization и генетическими перестройками приобрела особый интерес, поскольку впервые наметилась взаимосвязь между аномалиями органогенеза (дисрегуляция Нох-генов) и внутриутробным карциногенезом. Характерно, что главные 4 группы Нох-генов расположены на четвертой хромосоме человека и мыши. Возникновение первичного кроветворения в желточном мешке связано с экспрессией Нох-генов. Если обычные клоны эритро- и миелопоеза характеризовались умеренной экспрессией Нох-1 гена (миелопоез) и Нох-2 гена (эритропоез), то возникновение immortalized линий из упомянутых клонов сопровождалось увеличением экспрессии как Нох-1, так и Нох-2 (Vieille-Grosjean I., Roullot V., Curtis G., 1992)

Первый вариант хромосомных перестроек связан с переносом онкогенов в область экспрессии ранних генов органогенеза. Чаще всего такие перестройки выявлялись появлением immortalized клонов в провизорной кроветворной системе (желточный мешок, фетальная печень). Второй вариант малигнизации прогениторных клеток кроветворения – образование новых химерных белков в результате слияния двух генов в один. Образование таких «гибридных» молекул, особенно из факторов

генетической транскрипции (TAL1 (SCL), LMO2, AML1, CBF) приводил к иммортализации отдельных прогениторных клеток в миелоидных или эритроидных клонах. Самой распространенной молекулярной «химерой» (более 20% случаев пре-B-прогениторной лейкемии детей) оказалась новая гибридная молекула E2A-PBX1. 80 % случаев такого заболевания эффективно контролируется химиотерапией. Другая гибридная конструкция из двух слившихся белков TEL-AML1 обнаружена лишь в 20 % случаев лейкемии у детей. Характерно, что главным средством лечения является ретиноевая кислота – универсальный индуктор дифференцировки ЭСК, останавливающей митозы прогениторных клеток.

Далее выяснилось, что аномалии экспрессии генов сегментации и гомеозиса в провизорных клонах зародыша также ведут к онкогенезу зародышевых клеток.

Избыточная экспрессия гена НохВ4 (в том числе, на почве транслокации) вызывает перепродукцию незрелых прогениторных популяций в гематогенных клонах. Мыши, родившиеся с такой аномалией развития, имеют миелоидную дисплазию, спленомегалию, ограниченный срок жизни. Избыточная экспрессия гена Нох –А10 ведет к неконтролируемой пролиферации колоний мегакариоцитов, с одновременным уменьшением прогениторных популяций моно- и лимфо-ряда.

У детей, как и у млекопитающих выявлены формы лейкоза, при котором в иммортализованных клонах чаще всего экспрессированы следующие Нох- гены: MLL, MLL-AF9, MLL-AF4, trx-G, Vmi-1. Часто подвергается перестройке с последующей фузией Нох-А9 ген. Пока не ясно, каким образом отклонения в экспрессии Нох-генов ведут к иммортализации клонов стволовых/прогениторных клеток в зародышах. Возможно, что возникающие дефектные, аномальные клетки ускользают от апоптоза.

Ген эритропоетина и Нох-В6 ген расположены на одной хромосоме и подвержены одновременной экспрессии в разных органах кроветворения у зародышей (Zimmerman F., Rich I.N., 1997). Существенно, что одновременная экспрессия Нох-В6 и эритропоетина обнаружена в эритропоетических клонах *in vitro*. Экспрессия генов не выявлена в стволовых, но показана в митотических прогениторных клетках.

Известно, что ген *Pten* контролирует синтез белка-супрессора опухолевого роста. Показано, что нейросферы, изолированные из мозга зародышей мыши *Pten*<sup>-/-</sup>, характеризуются более интенсивной пролиферацией прогениторных клеток в культуре.

Избыточная экспрессия *HoxA9* вместе с *Pvх* вызывает иммортализацию гематогенных клеток (Schnabel C.A., Jacobs Y., Clearly M.L., 2000)

Региональная экспрессия *HoxA5* и *HoxB7* генов в клонах стволовых клеток волосяных фолликул связана с подавлением региональной дифференцировки прогениторных клеток (LaCelle P.T., Polakowska R.R., 2001). Иммортализацию CD34+ гематогенных стволовых клеток *in vitro* можно вызвать трансфекцией гена *Hox-C4* в комбинации с ретровирусным вектором (Daga A., Podesta M., Capra M.C. et al., 2000). Скорость пролиферации трансфицированных клонов возрастала в 10-13 раз.

Делеция гена *Wnt7* – master gene рестрикционного созревания альвеолярного эпителия легких связана с множественными случаями раннего канцерогенеза альвеолярного эпителия (Calvo R., West J., Erickson P. et al., 2000). В зародыше экспрессия *Wnt7* автоматически сопряжена с включением следующих генов: *Hox-A1*, *Hox A7*, *Hox-A9*, *Hox-A10*, *Hox –B9*, контролирующими организованный морфогенез эпителия альвеол. При выключении *Wnt7* и сопряженном выключении упомянутых *Hox*-генов наблюдается неорганизованный и нелимитированный рост альвеолярного эпителия, который приводит к образованию типичных опухолей в легких уже во внутриутробном развитии.

У мышей *Hox-B6*<sup>-/-</sup> резко увеличена доля незрелых прогениторных клеток в эритроидных ростках (Karpen C., 2000). С помощью пересадок ЭСК подсчитано, что закладка эпителиальной части тимуса развивается из 900 founder cells, которые в зародыше мыши сохраняются в дормантносм состоянии на 16-18 дне внутриутробного развития. Пересадки «блоков» этих прогениторных клеток вызывает быструю реконструкцию поврежденной железы реципиента (Rodewald .R., Paul S., Haller S. et al., 2001). У зародышей мыши *Hox11*<sup>-/-</sup> нарушается формирование селезенки. Стромальные *Hox11*<sup>-/-</sup> клетки концентрируются в виде неорганизованного



конденсата между желудком и поджелудочной железой, мутантные клетки плохо пролиферируют и практически не мигрируют в зачаток селезенки (Kanzler B., Dear T.N., 2001)

## **9. ЭСК - новый биоресурс медицины**

С помощью ЭСК разрабатываются эффективные технологии лечения многих наследственных заболеваний, которые не удалось решить методами молекулярной генетики, включая средства генной терапии. Прежде всего в целях экстренной помощи (острая недостаточность органа) обоснованы и допустимы трансплантации аллогенных стволовых клеток, которые в определенных условиях микроокружения способны дать ростки донорской ткани в органе-реципиенте в количестве, достаточном для компенсации генетического дефекта (Geiger H., Sick S., Bonifers C. et al., 1998). Доказано, что лишь 3-5% генетически нормальных клеток достаточно, чтобы восстановить утраченную биохимическую функцию поврежденной печени, скелетной мышцы, эндокринной железы (Репин В.С., 1998)

Пересадки ЭСК и их дериватов в недалеком будущем окажутся наиболее эффективным способом регионального воздействия как на фенотип составляющих орган клеток, так и поведение клеток, контролирующих важнейшие функции органа. Например, пересадки овальных стволовых клеток, содержащих лишний экспрессированный ген HGF, IGF1, SCF и других митогенов восстанавливают резистентность печени к циррозу на почве алкоголизма или персистирующей вирусной инфекции (Kaido T., Yamaoka S., Tanaka J. et al., 1996, Kobayashi Y., Hamanoue M., Ueno S. et al., 1996; Ueki T., Kaneda Y., Tsutsui h. ET AL., 1999). Аналогичным образом, пересадки аутогенных миобластов, трансфицированных геном HGF и (или) IGF1, могут стимулировать регенерацию и сохранение массы мышц при различных формах ускоренного старения или миодистрофии (Sheenan. S., Tatsumi R., Temm-Grove C. et al., 2000). Пересадки аутогенных миобластов, трансфицированных генами HGF, блокировали фиброз и почечную недостаточность за счет неогенеза тубул из стволовых пулов почки (Yang J., Liu Y., 2002)

Хотя первые протоколы изолирования и пассирования ЭСК в виде самовоспроизводящихся линий появились около 20 лет назад, выделение ЭСК из зародышей остается искусством, а не стандартной GMP-процедурой. Причина - незнание многих свойств и характеристик гетерогенных ЭСК как *in situ*, так и *in vitro*. Например, эффективность изолирования мышинных ЭСК разных генетических линий существенно варьирует. Стабильно удается выделять только ЭСК трех линий мышей: 129, C57BL/6 и alpha-hybrid. Опыты с ЭСК из C57BL/6 воспроизводились гораздо хуже, чем ЭСК из линии 129. Иммуортиализованные линии мезенхимальных стволовых линий, выведенные в пассажи из одного образца стромы, также характеризуются выраженной биохимической гетерогенностью, разным профилем цитокинов, ростовых факторов, неидентичностью способностью поддерживать рост гематогенных колоний, а также репертуаром химической дифференцировки (Dormady S.P., Bashayn O., Dougherty R. et al., 2001). Для оптимального роста эти линии нуждаются в добавлении 8-12 цитокинов и ростовых факторов (взамен фидера).

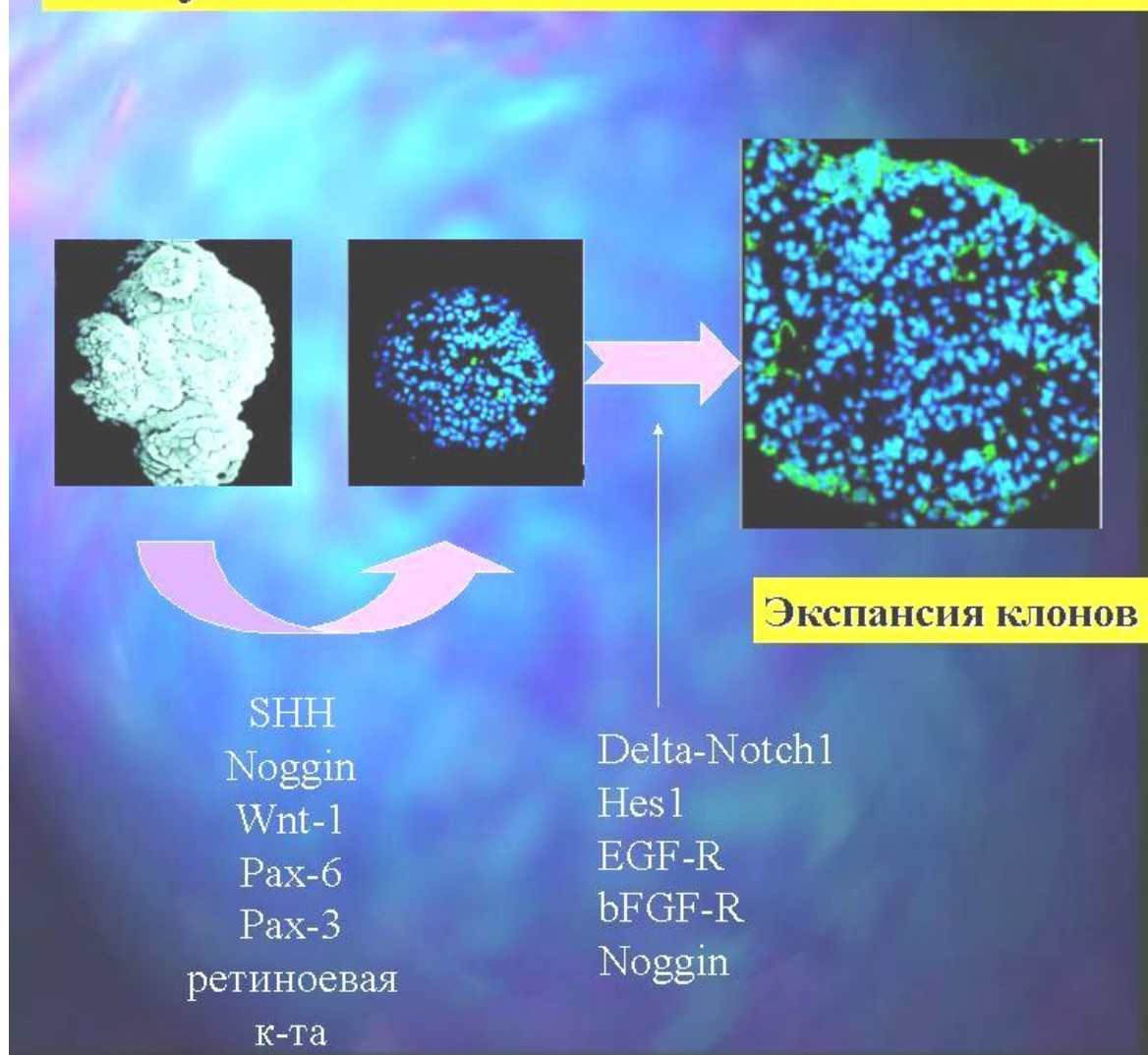
Геномные различия влияют на процент ЭСК среди клеток эмбриобласта. Многоэтапное созревание тотипотентных клеток зависело от фидера и LIF. Если эмбриобласт не реагировал на LIF, то ЭСК не удавалось пассировать без фидера. Первичные пролиферирующие суспензионные клоны ЭСК после диссоциации эмбриобласта всегда гетерогенны. Лишь небольшое число клонов содержали интенсивно пролиферирующие клетки. Не только клетки трофобласта, но и плохо пролиферирующие клоны ингибировали созревание ЭСК. Быстро растущие колонии необходимо изолировать и культивировать в микровеллах. Новую линию ЭСК изолировали из одного бурно пролиферирующего клона (но не одной клетки). Мышинные линии ЭСК - рекордсмены продуктивности. Они нарабатывали до 1-10 млрд стандартных незрелых тотипотентных клеток. Блостоцисты разных генетических линий генерировали разное количество активно пролиферирующих клонов.

С помощью ЭСК впервые верифицированы два источника хондроцитов (главных клеток хряща). Как известно в ходе эмбриогенеза *in situ* преобладающая клеточная масса хряща возникала из мезенхимальных стволовых клеток. В культуре под влиянием комбинации BMP-2, BMP-4 тотипотентные клетки тератокарциномы или линии ЭСК мышей дифференцировались в хондроциты и адипоциты в обход

мезенхимы (Kramer J., Hegert C., Guan K. et al., 2000). Под влиянием других сигналов тотипотентные мезенхимальные стволовые клетки человека хорошо дифференцировались в адипоциты.

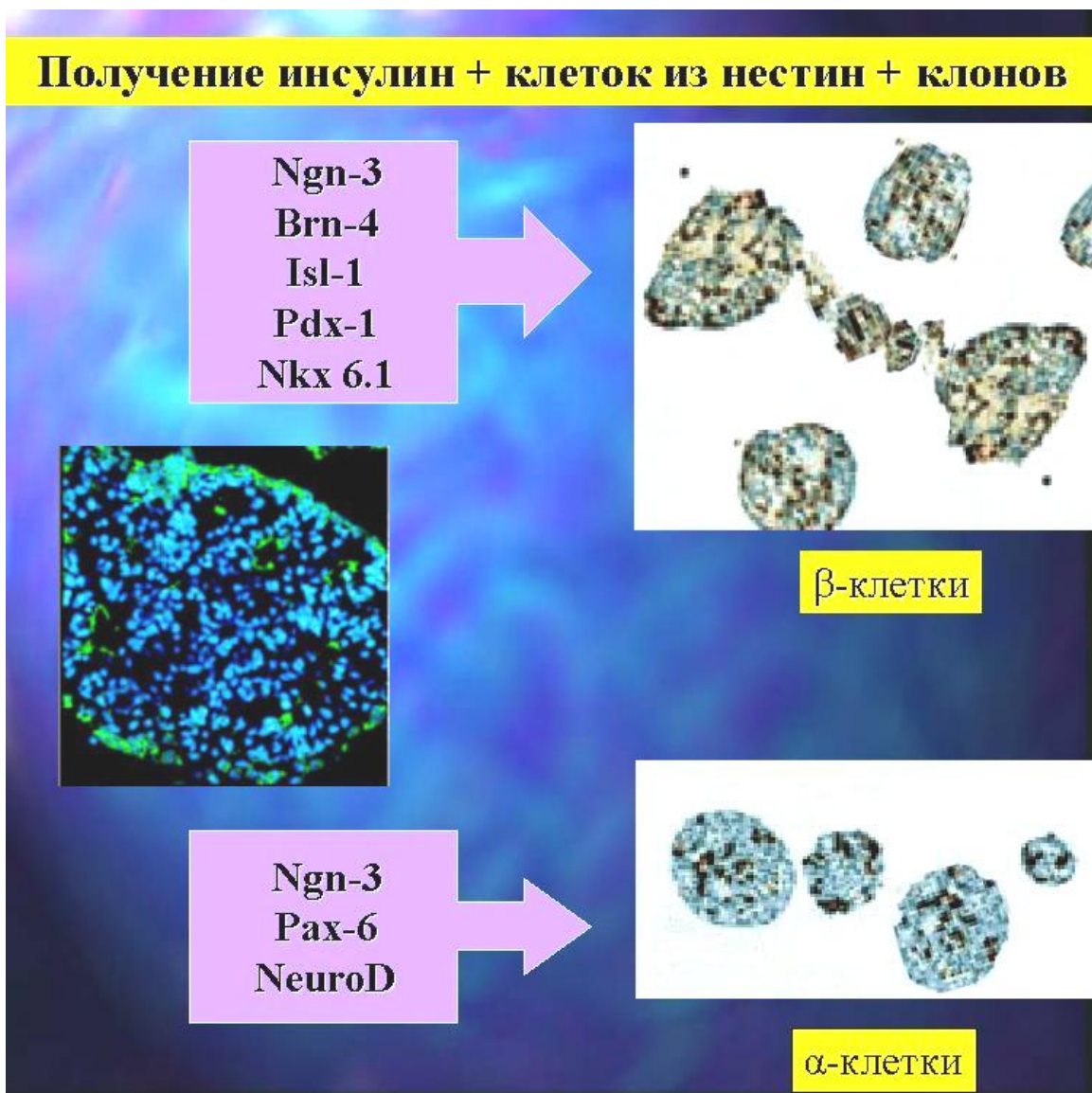
Последний характерный пример нового прорыва с ЭСК - лабораторное получение клеток эндокринной части поджелудочной железы в обход органогенеза. В ранних наблюдениях было показано, что часть клеток в культуре НСК спонтанно дифференцировались в клетки, продуцирующие инсулин. Позже было обнаружено сходство программы начальной генной экспрессии в НСК и эндокринной части поджелудочной железы. Стволовые клетки поджелудочной железы и головного мозга имели нестин и общие экспрессированные гены. Возникновение инсулин-продуцирующих клеток требовало более однородной популяции некоммитированных клеток в культуре. Некоторые клеточные примеси блокировали программу созревания эндокринных клеток поджелудочной железы.

## Получение нестин + клонов из ЭСК



**Рис 1-11. Получение нестин+ клонов прогениторных клеток из ЭСК**

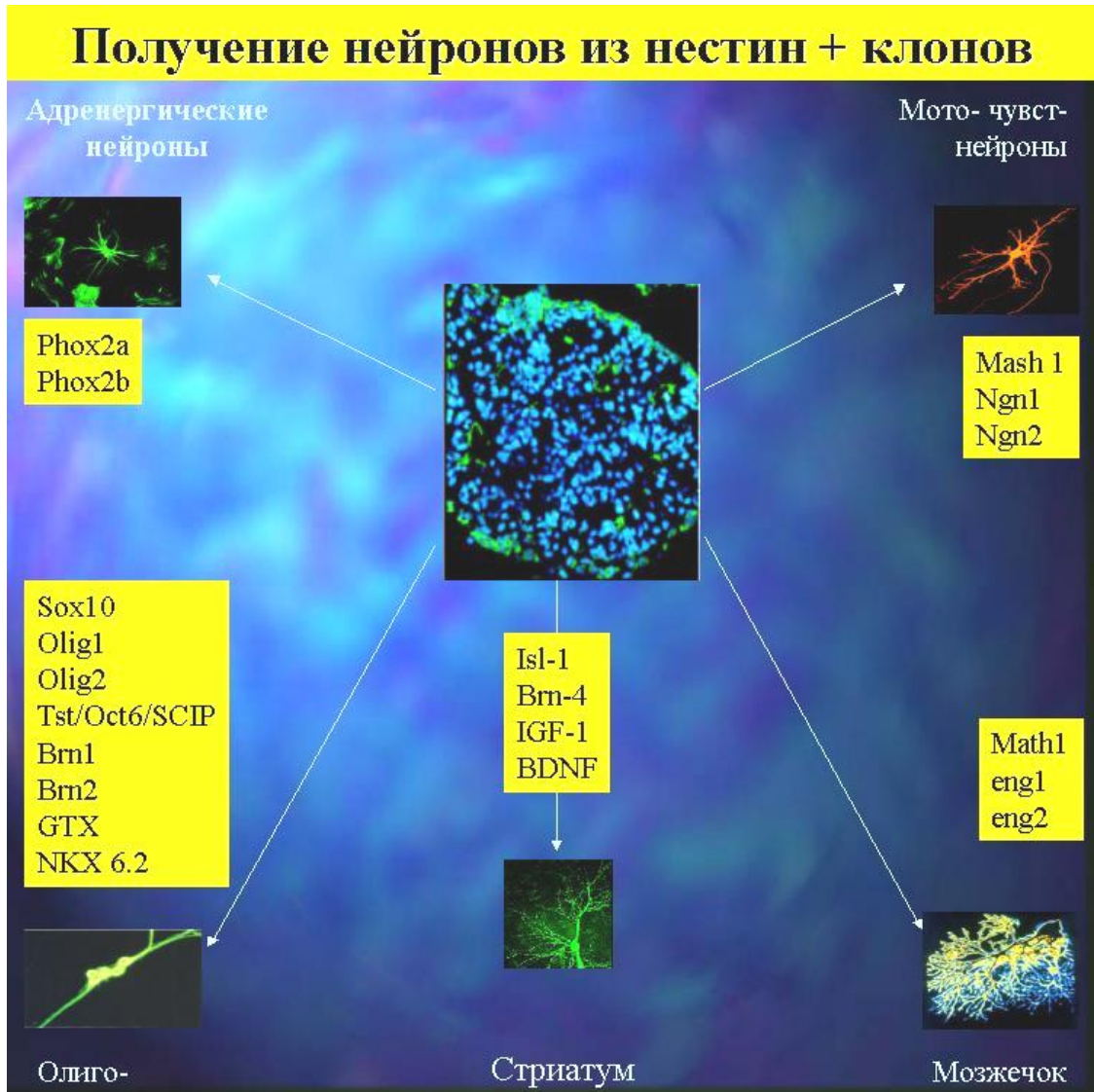
Последовательность включения ранних генов, контролирующих рестрикционное созревание нейронов и инсулин-продуцирующих клеток была прослежена на однородной популяции нестин+ прогениторных клеток. Смешанные популяции НСК, имеющие другие маркеры (виментин, GFAP) не генерировали бета- или альфа-клеток.



**Рис 1-12. Наборы soft-сигналов для получения инсулин-продуцирующих и глюкагон-продуцирующих клеток из НСК**

Научившись селективно размножать нестин+ НСК, авторы расшифровали комбинацию химических сигналов, которые направляли созревание прогениторных клеток либо в нейроны, либо в бета- и альфа-клетки. Фенотип лабораторных клеток островков Лангерганса был похожим на фенотип природных эндокринных клеток. Лабораторно полученные бета-клетки с пока низкой эффективностью нормализовали гипергликемию у животных с экспериментальным диабетом (Soria B., Roche E., Berna

G., et al, 2000).. Содержание проинсулина в этих клетках было меньше, чем в природных.



**Рис 1-13. Получение разных линий нейронов из общего пула нестин+ субпопуляций НСК *in vitro***

Впервые были найдены лабораторные способы наработки стволовых клеток мозга и показано, как химические сигналы направляли дифференцировку клеток в клоне. . Хотя уровень инсулина в полученных лабораторных бета-клетках был ниже, чем в природных островках, этот первый решенный генетический ребус помог найти software самого включения гена инсулина. Решить проблему количественной экспрессии будет проще.

Проблема происхождения эндотелиальных клеток была долгое время неразрешимым вопросом клеточной эмбриологии, исследовавшей появление новых линий специализированных клеток *in situ*. Исследования на ЭСК мышей сумели добавить новую страницу знаний. Хотя было известно, что первичные эндотелиоциты возникают из мезодермы, не удалось найти маркерных антител для самых ранних популяций. (Nishikawa S., Hirashima M., Nishikawa S. et al., 2001). Такие общеизвестные маркеры “раннего” фенотипа эндотелиальных клеток как Flk –рецептор и E-cadherin оказались непригодными, поскольку метили все клетки мезодермы. Более селективные маркеры выявили с помощью клеточного сортера, который помог изолировать субпопуляцию VEGFR2+ Flk- E-cadh – клеток. В специальных средах эти предшественники дифференцировались в эндотелиоциты. Показательно, что фидер OP9 из стромальных клеток поддерживал клоногенный рост эндотелиальных стволовых клеток. Введение цветного белка в стволовые клетки позволило визуализировать динамику созревания клонов. Таким образом, в лаборатории был не только прослежен по этапам путь созревания ЭСК в стволовую эндотелиальную клетку, но и налажено производство этих уникальных клеток со скоростью 10 (7) клеток в минуту. Хорошо известно, что стволовые эндотелиальные клетки широко сейчас используются в опытах на животных для экспериментальной неоваскуляризации сердца, почек, других паренхиматозных органов. Первоначально факторы ангиогенеза (рекомбинантные VEGF, FGF, HGF) рассматривались в качестве агентов No1 реваскуляризации ишемизированного сердца, почек, скелетной мышцы (Freedman S.B., Isner J.M., 2002; Toyoda M., Takayama H., Horiguchi N. Et al., 2001). Однако в последние годы все больший акцент делается на экспериментальную пересадку стволовых / прогениторных эндотелиальных предшественников с целью реорганизации микроциркуляции и улучшения кровоснабжения в ишемизированной ткани (терапевтический васкулогенез) (Miyobara T., 2001). Стволовые клетки эндотелия также, по-видимому, характеризуются множественным фенотипом. Так, предшественники эндотелиальных клеток, идентифицированные в постнатальном коллатеральном мозге человека, имели иммунофенотип, отличный от фенотипа стволовых клеток, получаемых через ЭСК (Reyes M/, Dudek A., Jahagridar A. et al., 2002).

Хотя на рынке биоуслуг предлагается более 100 линий ЭСК, многие из них при трансплантации в бластоцисту не химеризуют зародыш, т.е. малоэффективны для изучения закономерностей постимплантационного эмбриогенеза. (O'Shea K.S., 1999). Однако у некоторых тщательно отобранных линий ТК и ЭСК удается вызвать экспрессию маркерных генов эпибласта, эстраэмбриональной энтодермы или первичной полоски. Эти селектированные линии ЭСК могут принести максимальную пользу в получении неограниченных клеточных масс эпибласта – главного биосырья банков клеток человека. Получение клеток эпибласта в обход оплодотворения и беременности будет второй революцией в биологии (после получения линий ЭСК человека), которая создаст фундамент новой медицины, использующей закономерности эмбриогенеза и клеточной регенерации для защиты от наиболее распространенных фатальных заболеваний человека.

Получение специализированных клеток с варьирующим фенотипом идет в двух направлениях: а) через спонтанно формирующиеся эмбрионные тельца (плюрипотентную зародышевую ткань) б) через культуру одиночных клеток ЭСК путем стимуляции начальной дифференцировки в трансфицированных клетках. Например, стимуляцию кардиогенеза вызывают лишней дозой гена *Nkx-5-2*, эритропоэза – лишней дозой *НохВ4*, нейрогенеза – лишней дозой *Neuro D*, миогенеза – лишней дозой *Myo D* гена. Хотя получаемые по этой прописи кардиомиоциты имеют полный фенотип, набор рецепторов и электровозбудимые ионные каналы, их выживаемость *in vitro* ограничена по сравнению с кардиомиоцитами, получаемыми из эмбрионных теллец. Различия двух клеточных популяций кардиомиоцитов проявляются не на уровне элементарного биохимического фенотипа, а на уровне поведения клеток, которое определяется согласованной работой всех биохимических машин и *soft*- программ кардиомиоцитов.



## 10. ЭСК: законодательство и биоэтика

После создания методов генной инженерии, рекомбинантных технологий переноса ДНК между клетками разных видов, завершения программы «Геном человека», получения первых линий ЭСК человека возникла новая биоэтика фундаментальных процессов, стоящих у истоков индивидуальной жизни. Эти новые реальности биоэтики нашли отражение в документе ЮНЕСКО: Биоэтика: международные аспекты (октябрь, 2001). Документ резюмирует итоги многочисленных круглых столов (52 государств на уровне руководителей министерств науки) по следующим стратегическим направлениям: а) эволюция базисных концепций и принципов биоэтики (достоинство, автономия, самоценность личности и прав с экстраполяцией на внутриутробный период развития человека); б) этика и научные исследования с клетками зародыша (предимплантационная диагностика заболеваний) в) использование геномных данных для диагностики и лечения (разработка новых биотехнологий получения зародышевых клеток); г) генетически модифицированные зародыши, клетки, линии ЭСК д) донорство и пересадки зародышевых клеток, включая ЭСК д) создание универсальных основ биоэтики и подготовка глобальных документов, регламентирующих деятельность ученых в этих областях биологии и медицины . В принятой ЮНЕСКО Универсальной Декларации о геноме человека и правах человека (1999 г) в статье 11 говорится: « Практика, противоречащая человеческому достоинству, как репродуктивное клонирование человека, не разрешается. Государства и компетентные международные организации призываются начать кооперацию в идентификации злоупотреблений и разработке необходимых мер на государственном/межгосударственном уровне для выполнения принципов Декларации». При этом в следующей статье 12 Декларации постулируется: « Свобода научных исследований, необходимых для прогресса знаний, есть часть свободы мысли. Практическое приложение знаний генома человека должно быть направлено на уменьшение человеческих страданий, улучшения здоровья как индивидов, так и всего человечества». Разработки с геномом ЭСК есть часть этой общей стратегии.

В Германии закон запрещает получение ЭСК, но разрешает работать ученым с импортированными линиями ЭСК. Госфинансирование позволяет работать с ЭСК

животных и СК из тканей взрослого человека. В 2002 году Германия и Франция выступили с инициативой в ООН относительно глобального моратория на эксперименты по репродуктивному и терапевтическому клонированию человека.

В Швейцарии закон запрещает эксперименты с ранними зародышами, включая терапевтическое клонирование стволовых клеток из бластоцист. Разрешено работать с импортированными ЭСК, но под строгим государственным контролем. В ООН Швейцария предложила рассмотреть вопрос о срочном первоочередном вето на любые эксперименты по репродуктивному клонированию (создание нового зародыша или взрослого организма из генома уже существовавшего человека). Вопросы, связанные с терапевтическим клонированием (включая создание и разрушение лабораторных бластоцист и предимплантационных зародышей) предложено рассмотреть в отдельном пакете, поскольку еще недостаточно научных данных, чтобы разобратся в альтернативных способах получения пролиферирующих плюрипотентных клеток.

Во Франции разрешено работать с уже созданными ЭСК человека и получать новые линии с целью терапевтического клонирования органов и тканей больного человека. Запрещено репродукционное клонирование. В настоящее время Франция и Германия инициировали дискуссию в ООН о подготовке международной конвенции запрещающей репродукционное и терапевтическое клонирование плюрипотентных клеток в обход полового процесса.

В Израиле принят закон о временном пятилетнем моратории на репродуктивное клонирование. Закон не регламентирует исследования с ЭСК с целью терапевтического клонирования и создания банков клеток для трансплантации. Ситуация с использованием ЭСК трактуется на базе притчи из Ветхого Завета. Там сказано, что Бог создал пшеничное зерно, чтобы человек научился добывать хлеб насущный. ЭСК создана, чтобы человек научился ими пользоваться во имя здоровья.

В Великобритании, Бельгии и Швеции разрешены эксперименты с ЭСК для терапевтического клонирования клеток больного человека. Закон разрешил создание первого банка ЭСК. Разрешено создание и клонирование предимплантационных зародышей (до 14-го дня развития) для изолирования линий ЭСК. Репродукционное

клонирование запрещено. Лицензии на работу с ранними зародышами и ЭСК выдаются специальной государственной комиссией.

В Канаде пока не принято законодательство в отношении ЭСК и ранних зародышей. Но ученые и парламент склоняются к английскому варианту проекта.

В Японии с июня 2001 г действует закон о запрещении репродуктивного клонирования, но разрешены эксперименты с зародышами, остающимися после процедуры искусственного оплодотворения. Репродукционное клонирование наказывается 10 годами тюрьмы и штрафом 90 000 ам. долларов. Закон позволяет клонировать предимплантационные зародыши для выделения ЭСК и создания банков клеток для трансплантации на их основе.

В США госфинансирование распространяется только на официально зарегистрированные линии ЭСК. Создавать или разрушать ранние зародыши запрещено. Две трети населения поддерживают те работы с ЭСК, которые направлены на лечение ныне живущих пациентов.

В России в первом чтении принят закон о временном (5-летнем) моратории на репродуктивное клонирование, в том числе частными компаниями. Нет никаких нормативных ограничений на работы с ЭСК с целью терапевтического клонирования. Статус предимплантационных зародышей и внутриутробной жизни не имеет юридической нормы. Поэтому законодательство о правах человека не распространяется на эти стадии онтогенеза человека. Права зародышей могут защищаться только средствами биоэтики. Аналогично ситуация трактуется в Великобритании, где парламент разрешил клонирование ранних зародышей человека для получения ЭСК.

В Индии и Китае активно ведутся исследования как по получению линий ЭСК человека, так и разработке получения ЭСК из других биоисточников (межвидовых клеточных гибридов).

Разрыв между биоэтическими требованиями и реальным законодательством создает нерешенные узлы проблем:

а) христианская биоэтика наделяет одноклеточный зародыш статусом новой жизни. Однако в западных клиниках разрешено криоконсервирование зигот и предимплантационных зародышей. Разрешены банки спермиев и яйцеклеток. Созданы

все предпосылки для неконтролируемого получения лабораторных зародышей человека.

в) разрешено донорство яйцеклеток и спермы не только для целей искусственного оплодотворения

г) не исключено, что генетические потенции ЭСК, а также мультипотентных стволовых клеток взрослого организма будут доведены до уровня тотипотентности зиготы. Это приведет к размыванию границ возможного в создании лабораторной одноклеточной/многоклеточной жизни, стыков клетки/организма

История биологии показала, что нормирование законами любых спорных ситуаций лишь приносит вред науке и обществу. Только дальнейшее продвижение науки и ее практических границ порождает новые реалии, а с ними - новую биоэтику.

Биоэтика играет важную роль мягкого буфера, позволяющего развивать науку на максимальном приросте полезных знаний с минимальными ошибками и злоупотреблениями. Злоупотребления порождаются не наукой, а бизнесом вокруг науки. Биотехнологические компании занимаются активно репродуктивным клонированием домашних животных на коммерческой основе. Уже первые шаги в этом направлении показывают, что фенотипы клонов, получаемых техникой переноса ядра соматических клеток, весьма варьируют, поскольку перкодирование генотипа в фенотип клеток зародыша жестко не контролируется в онтогенезе (фенотип СС- кошек, клонированных мышей и коз). Даже генетически тождественные организмы никогда не будут полными фенотипиями с учетом того, что фенотип любого организма изменяется во времени по мере старения. Поэтому биологический возраст донорских клеток будет существенно влиять на получаемые фенотипы клонов. Получение здорового потомства репродуктивным клонированием остается главной нерешенной проблемой. Есть предварительные данные о том, что эмбриогенез клонированных млекопитающих пока протекает с многочисленными ошибками, что приводит к болезням в постнатальном периоде. Потребуется значительное время, чтобы сделать соматический эмбриогенез подлинной наукой, на базе которой будут созданы эффективные и надежные процедуры клонирования у млекопитающих. До завершения опытов на животных невозможно начинать непресказуемые

эксперименты с лабораторным воспроизведением постимплантационного эмбриогенеза человека.

## **11. Мост между наукой и клиникой**

За последнее десятилетие, особенно после завершения программы «Геном человека» наметились заметные сдвиги в понимании роли клеток, особенно аномалий поведения клеточных популяций в патогенезе ведущих заболеваний человека. Опухолевые болезни человека рассматриваются как вариант аномального поведения стволовых/прогениторных клеток. Эти аномалии ускользают от контроля иммунных и информационных контрольных систем организма. Атеросклеротические бляшки представляют собой региональные дисплазии дериватов мезенхимы. Фиброзные дегенерации паренхиматозных органов, включая цирроз печени, рассматриваются как дисбаланс пролиферации (самообновления) стволовых клеток паренхимы и мезенхимы. Изменение относительных скоростей самообновления паренхиматозной и стромальной ткани ведет к превалированию стромы (фиброз, глиоз и т.д.). Интерес постгеномики сместился от отдельных генов с функциональным сетям генома, в которых одновременно задействованы сотни генов в тысячах разных клеток. Поведение клеток складывается из непрерывной работы митохондрий, ядра, рибосом, рецепторов, переносчиков ионов и помп. Ошибки в сигнальной сети, управляющей согласованной активностью клеток в тканях, являются частью видимых нарушений. Многие заболевания возникают как поломки "«oftware", контролирующей переход, трансляцию биохимии внутриклеточных машин в целенаправленное поведение клеток. Поэтому современные подходы в биологии требуют изучения поведения клеток в культуре.

Культура клеток – это единственно морально допустимый эксперимент на больном человеке. Артриты, эндоатериты, ишемические болезни органов рассматривают с позиций клеточной реорганизации ткани, на базе аномалий поведения клеток, либо нарушений межклеточных коммуникаций. Средством лечения становятся стволовые клетки и soft-сигналы стволовых пространств, обеспечивающих повторную

реорганизацию архитектоники эндотелия, капилляров, сосудов, баланс мезенхимальной и паренхимальной ткани. Здоровый клеточный статус органов обеспечивается за счет периодической самообновляемости клеток. Трансплантация стволовых /прогениторных клеток вместе с цитокинами и митогенами стволовых пространств ускоряет замену больных клеток на здоровые.

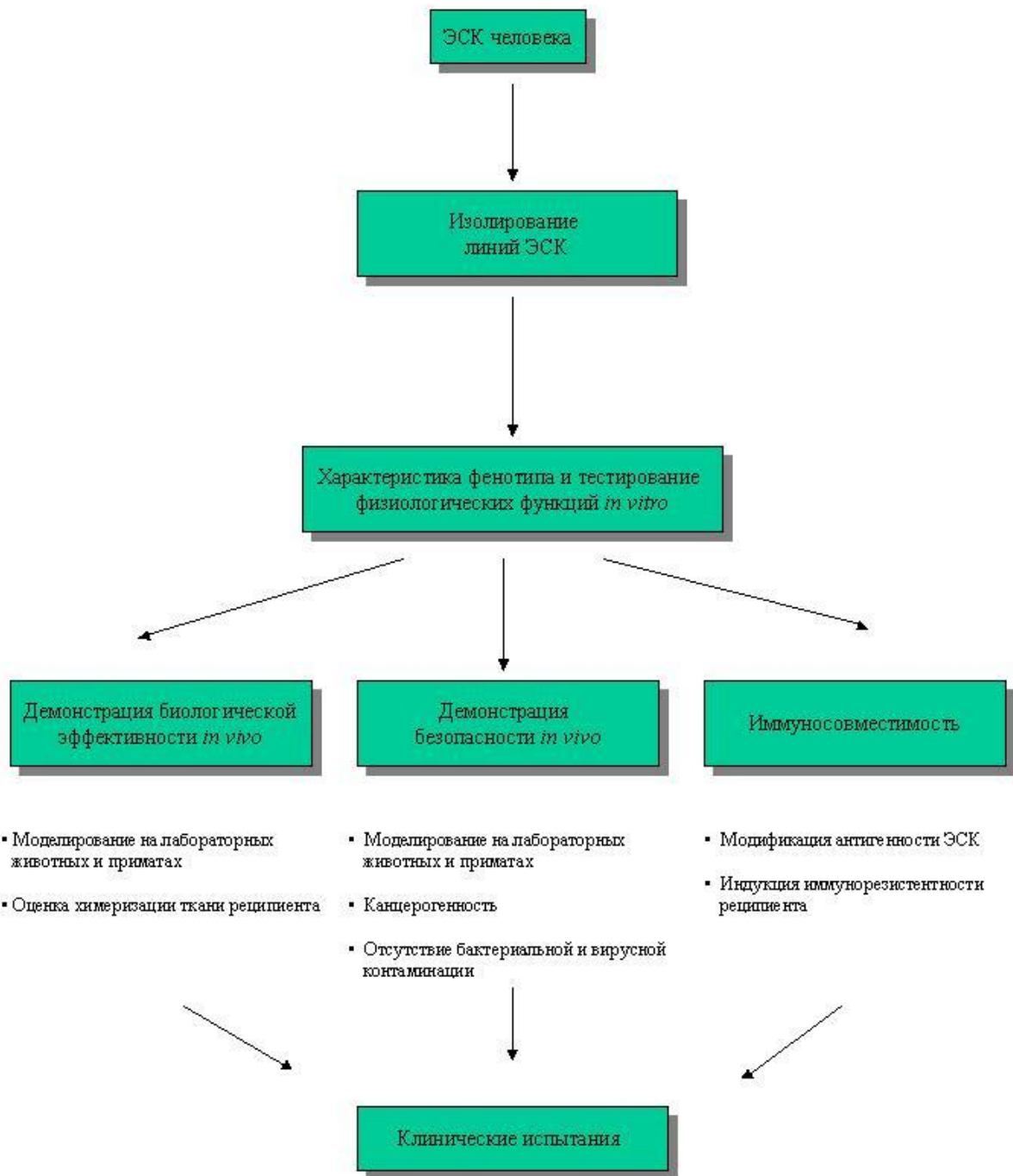
Однако между важными фундаментальными находками в экспериментах на животных и их клинической апробацией сохраняется длинная дистанция. Менее 1% всех важнейших находок вокруг ЭСК находят применение у постели больного. Не вызывает сомнений, что в ближайшее время огромные финансы вместе с научными ресурсами будут затрачены на решительное сокращение расстояния между научными данными и той формой знаний и умений, которые получают “зеленый свет” в клинику. Крупнейшие биотехнологические компании уже “затоварены” патентами, поскольку за год удастся осваивать 1-2 новых открытия. Глобальная сетевая компьютеризация биомедицинских исследований позволит упростить и стандартизировать схемы предклинических испытаний и систему критериев для переноса работы в клинику.

Превращение стандартно выделенных ЭСК в биотрансплантат требует стандартизации всей технологической цепочки: выделения, наращивания, дифференцировки получаемых клеток по системе международных общепринятых критериев..

GMP-протокол выделения ЭСК и их дериватов требует стандартизация на уровне верхних критериев качества следующих этапов лабораторной работы: а) качество помещений и оборудования для проведения стерильного выращивания клеток б) качество посуды разового пользования и реагентов в) квалификация и экспертиза специалистов г) характеристика исходного материала для выделения ЭСК д) выделение клеток из тканей по системе общепринятых критериев жизнеспособности клеток, очистки, морфологической целостности, функциональной активности. GMP-протокол выделения ЭСК должен верифицировать выделение малой популяции клеток из первичного источника, избирательную пролиферацию и накопление доли интересующих жизнеспособных, функционально активных прогениторных клеток. Первый этап GMP-протокола связан с прописью (методикой) получения желаемого количества незрелых прогениторных клеток в виде биосырья для второго биотехнологического этапа.

Второй этап GMP- протокола содержит информацию о путях лабораторного (in vitro) получения макроколичеств (10<sup>7</sup>- 10<sup>9</sup>) моно-дифференцированных клеток в условиях культуры.

На третьем этапе в опыте на животных демонстрируется безопасность (biosafety) пересаживаемых клеток, их терапевтическая эффективность, а также отсутствие иммунологических вторичных реакций на трансплантат. GMP-технологии стандартного единообразного повторяемого выращивания стволовых клеток являются мостом, соединяющим работу специалиста биолога в лаборатории с технологией good clinical practice (GCP), которая обязательно воспроизводится при первом, втором и третьем клиническом испытании новых биоактивных препаратов (особенно живых клеток).



**Рис 1-13. От GLP-технологии выделения стволовых клеток к GCP- клиническим испытаниям биотрансплантата**



## 12. Литература

Репин В.С., Медицинская клеточная биология, 1998, БЭБМ, Москва

Репин В.С. Эмбриональная стволовая клетка (от фундаментальной биологии к медицине), Усп. физиол.наук, 2001, 32, 3-19

Репин В.С. Эмбриональная стволовая клетка, Патол. физиология и эксперим.терапия, 2001, вып.2, 3-8

Akira S., Functional Role of STAT family proteins: Lessons from Knockout Mice, PNAS, 1999, 17, 138-46

Andrews P.W., Przyborski S., Thomson J.A., Embryonal carcinoma cells as ESC, In: Stem Cell Biology, (ed. Marshak D.R., Gardner R.L., Gottlieb D.), CSH Lab.Press, 2001, 231-66

Beddington R., Robertson E.J., Axis development and early assymetry in mammals, Cell, 1999, 96, 195-209

Brüstle O, Jones K, Lereaish R. et al., Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants, Science, 1999; 285, 754-756

Charkravathy M.V., Spangenberg E.E., Booth F.W., Culture in low level of oxygen enhances in vitro proliferation potential of muscle satellite cells, Cell Mol. Life Sci., 2001, 58, 1150-58

Chaudhary J., Johnson J., Kim J. et al., Hormonal regulation and differential action of HLH transcriptional inhibitors of differentiation (ID1, ID2, Id3, Id4) in Sertoli cells, Endocrinology, 2001, 142, 1727-36

Cho S.K., Webber T.D., Carlyle J. et al., Functional characteristics of B lymphocytes generated in vitro from mouse ESC, Proc.Natl.Acad.Sci.US, 1999, 96, 9797-802

Cibelli J., Stice S.I., Robl J.M. et al., Transgenic bovine chimeric offsprings produced from somatic cell derived stem -like cells, Nature Biotechnol., 1998, 16, 642-46

Colman A., Kind A., Thrapeutic cloning: concepts and practicalities, TIBTECH, 2000, 18., 192-96

Compagnoli C., Fisk N., Tocci A. et al., Circulating stromal cells in first trimester fetal blood, Blood (Suppl.1), 94, 38a, (Abstr 157)

Daga A., Podesta M., Capra M.C. et al., The retroviral transduction of Hox-C4 into human CD34+ cells induces the expansion an in vitro clonogenic and early progenitors, *Exp. Hematol.*, 2000, 28, 569-74

Dale K.J., Pourquie O., A clock-work somite, *BioEssays*, 2000, 22, 72-83

Dani C., Smith A.G., Dessolin S. et al., Differentiation of ESC into adipocytes in vitro, *J. Cell. Sci.*, 1997, 110, 1279-85

Deans R.J., Moseley A.B., Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses, *Exp.Hematol.*,2000,28, 875-84

Doevendans P.A., Kubalak S.W., An R.H. et al., Differentiating cardiomyocytes in floating embryoid bodies is comparable to fetal cardiomyocytes, *J.Mol. Cell.Cardiol.*, 2000, 32, 839-51

Dormady S.P., Bashayan O., Dougherty R. et al., Immortalized multipotential mesenchymal stem cells in the hematopoietic microenvironment, *J.Hemotherapy, Stem Cell Res.*, 2001, 10, 125-40

Du Z., Cong H., Zhen Y., Identification of putative downstream genes of Oct4 by supression-subtractive hibridization, *Biochem.Biophys.Res.Comms.*,2001,282, 701-6

Fan Y., Melhem M., Chailier R., Forced expression of Hox-gene Pem blocks differentiation of ESC, *Dev. Biol.*, 1999,210, 481-96

Flake A.W., Fate Mapping of Stem Cells, In: *Stem Cell Biology*, (ed. Marshak D.R., Gardener R.L.,Gottlieb D.), CSH Lab.Press, 2001, 375-98

Freedman S.B., Isner J.M., Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease, *Ann. Int. Med.*, 2002, 136, 54-71

Friedenstein A.J., Chailachyan G.K., Latsinik N.V. et al., Stromal cellss responsible for transferring the microenvironment of the hemapoietic tissue. Cloning in vitro and retrotransplantation in vivo.,*Transplantation*,1974,17, 331-340

Friedenstein A.J., Owen M. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic progenitors,*CIBA Found.Symp.*,1988, 136, 42-60

Gage F., Mammalian Neural Stem Cells, *Science*, 2000, 287, 1433- 42

Geiger H., Sick S., Bonifers C. et al., Globin gene expression is reprogrammed in chimeras generated by injecting adult hepopoietic stem cells into mouse blastocysts, *Cell*, 1998, 93, 1055-65

Gook D.A., Osborn S.M., Johnston W.I., Parthenogenetic activation of human oocytes following cryopreservation using propandienol, *Human Rep.*, 1995, 10, 654-8

Guo X., Ying W., Wan J. et al., Proteomic characterization of early-stage differentiation of mouse ESC into neural cells induced by retinoic acid in vitro, *Electrophoresis*, 2001, 22, 3067-75

Harder F., Henschler R., Junghahn I., Human hematopoiesis in murine embryos after injection human cord blood derived hemopoietic stem cells into murine blastocyst, *Blood*, 2002, 99, 719-21

Indamar M., Koch T., Rapoport R. Et al., Yolk-sac-derived murine macrophage cell line has a counterpart during ES cell differentiation, *Dev.Dyn.*,1997, 210, 487-97

Jackson K.A., Mi T., Goodell M.A., Hematopoietic potential of stem cell isolated from murine skeletal muscle, *PNASUS*, 1999, 96, 14482-86

Kaido T., Yamaoka S., Tanaka J. et al., Continuous HGF supply from HGF-expressing fibroblasts transplanted into spleen prevents CCl4-induced acute liver injury in rats, *Biochem.Biophys.Res.Comms.*, 1996, 218, 1-5

Kanzler B., Dear T.N., Hox11 in spleen development, *Dev. Biol.*, 2001, 234, 231-43

Kappen C., Disruption of Hox-B6 genes results in increased numbers of f early erythrocyte progenitors in mice, *Am.J. Hematol.*, 2000, 65, 111-118

Kato Y.,Tani T., Sotomaru Y. et al., 8 calves cloned from somatic cells of single adult, *Science*, 1999, 288, 2095-98

Kawazaki H., Suemori H., Mizuseki K. et al., Generation of DOPA-neurons and pigmented epithelia from primate ESC by stromal cell-derived inducing activity, *Proc.Natl.Acad.SciUS*, 2002, 99, 1580-5

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, 108, 407-414

Kelli D.L., Rizzino A.; DNA Microarray analysis of genes regulated during the differentiation of embryonic stem cells; *Mol.Reprod.Devel.*,2000, v.56, 113-23.

Kikyo N., Wolffe, Reprogramming niclei: insights from cloning, nuclear transfer and heterokaryons, *J. Cell Sci.*, 2000, 113, 11-20

Knezevic V., Mackem S., Activation of epiblast gene expression by the hypoblast layer in the prestreak chick embryos, *Genesis*, 2001, 4, 264-73

Kobayashi Y., Hamanoue M., Ueno S. et al., Induction of hepatocyte growth by intraportal infusion of HGF into beagle dogs, *Biochem. Biophys. Res. Comms.*, 1996, 220, 7-12

Kollet O., Aviram R., Chebat J. et al., The soluble interleukin-6 (IL-6) receptor/IL-6 fusion protein enhance in vitro maintenance and proliferation of human CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>(low) cells capable of repopulating SCID mice, *Blood*, 1999, 94, 923-31

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, 346, 770-2

Kramer J., Hegert C., Guan K. et al., ESC-derived chondrogenic differentiation in vitro: the role of BMP-2 and BMP-4, *Mech. Dev.*, 2000, 92, 193-205

Kuznetsov S., Mankani M., Gronthos S. et al., Circulating skeletal stem cells, *J. Cell Biol.*, 2001, 1133-39

Labosky P.A., Weir M.P., Grabel L.B., Hox genes in teratocarcinoma embryoid bodies: a possible role of Hox-12 (Hox-4.7) gene in establishing extraembryonic endoderm lineage in the mouse, *Dev. Biol.*, 1993, 159, 232-44

LaCelle P.T., Polakowska R.R., Human Hox-A7 regulates retinocytes transglutaminase I and inhibits differentiation, *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 32844-53

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: implication for therapeutic use, *Bone Marrow Transpl.*, 1995, 16, 557-60

Leahy A., Xiong J.W., Kuhnert F. et al., Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation, *J. Exp. Zool.*, 1999, 284, 67-81

Lemischka I., The power of stem cell reconsidered ? *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 1999, 96, 14193-95

Liechy K.W., MacKenzie T.C., Shaaban A.F. et al., Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep, *Nature Med*, 2000, 6, 1282-86

Liang L., Bickembach J.R., Somatic epidermal cells can produce multiple cell lineages during development, *Stem Cells*, 2002, 20, 21-31

Ling V., Neben S., In Vitro differentiation of ESC, *J. Cell Physiol*, 1997, 171, 104-15

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 US*; 2000, 97, 6126-31

Long K.D., Kennedy G., Balaban E., Transferring an inborn auditory perceptual predisposition with interspecies brain transplants, *Proc.Natl.Acad.Sci US*, 2001, 98, 5862-7

Lumelsky N., Blondel O., McKey R. et al, Differentiation of ESC to insulin-secreting structures similar to Pancreatic Islets, *Science*, 2001, 292, 1389-93

Martin G.R., Isolation of pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in the medium conditioned by teratocarcinoma stem cells, *Proc.Natl. Acad. Sci. US*, 1981, 78, 7634-38

Marshak D.R., Gottlieb D., Gardner R.L., Introduction: Stem Cell Biology, In: *Stem Cell Biology*, 2001, CSH Lab.Press, N.Y., p.3

McBrearty B.A., Clark L.D., Zhang X.M. et al., Genetic analysis of mammalian wound-healing traits, *Proc. Natl. Acad.SciUS*, 1998, 95, 11792-97

McKey R., Stem cells in the Central Nervous System, *Science*, 1997, 276, 66-71

Mirobara T., Therapeutic vasculogenesis using human cord blood-derived endothelial progenitors, *Trends Cardiovasc. Med.*, 2001, 11., 303-7

Mountford P., Nichols J., Zevnik B. et al., Maintenance of pluripotent ESC by stem cell selection, *Reprod.Fertil. Dev.*, 1998, 10, 527- 33.

Morrison S.J., Shah N.M., Anderson D.J., Regulatory mechanism in stem cell biology, *Cell*, 1997, 88, 287-98

Muller U., 10- y of gene targeting biology: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis, *Mech. Dev.*, 1999, 82, 3-21

Nicols J., Zevnik B., Anastassiades K. Et al., Formation of pluripotent cells in the mammalian embryos depends on the POU transcription factor, *Cell*, 1998, 779-91

Nishikawa S., Hirashima M., Nishikawa S. et al., Cell biology of vascular endothelial cells, 2001, 947, 35-41

Nishimoto M., Fukushima A., Okuda A. Et al., The gene of ESC cell coactivator gene UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with complex of Oct4/Sox-2, *Mol. Cell Biol.*, 1999,19, 5453-65

Nogueira M.M., Mitjavila-Garcia M.T., LePadteur F. et al., Regulation of ID gene expression during ESC-derived hemapoietic stem cell differentiation, *Biochem.Biophys.Res.Comms.*,2000, 276, 803-12

Odorico J.S., Kaufman D.S., Thomson J.A., Multilineage differentiation from human ESC lines, *Stem Cells*, 2001, 19, 193-204

O'Shea K.S. Embryonic Stem Cell Models of Development, *Anat.Rec.*,1999, 257, 32-41

Patrick P., Tam L., Gad .L.M., et al., Morphogenetic tissue movement and the establishment of body plan during development from blastocyst to gastrula in the mouse, *BioEssays*, 2001, 23, 508-17

Pera M.F., Human pluripotent stem cells: a progress report, *Curr.Opin.Genet.Dev.*, 2001, 11, 595-99

Petit-Zeman S., Regenerative Medicine, *Nature Biotechnol.*,2001,19,201-205

Quaini F., Urban K., Bertrani A. et al, Chimerism of the transplanted heart, *N.Engl.J.Med.*,2002, 346, 55-6

Rathjen J., Lake J.A., Bettese M.D. et al., Formation of primitive ectoderm like cell population from ESC in response to biologically derived factors, *J.Cell Sci.*,1999,112, 601-12

Reubinoff B.E., Pera M.F., Fong C. et al., ESC lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro, *Nature Biotechnol.*, 2000, 18, 399-404

Reyes M., Dudek A., Jahagridar A. et al., Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow, *J.Clin. Invest.*,2002, 109, 337-46

Rhton-Vlasak L., Lu P.Y., Barud K.M. et al., Efficacy of Ca<sup>++</sup> ionophore A23187 oocyte activation for generation of parthenotes for human embryo research, *J.Assist. Repr.Genetic.*, 1996, 13, 793-6

Robertson E.J., Embryo-derived stem cell lines, In: *Teratocarcinoma and ESC: a practical approach*,Oxford,IRL Press, 1987, 71-112

Rodewald R.G., Paul S., Haller S. et al, Thymus medulla consists of epithelial islets ferived from a single progenitor, *Natue*, 2001, 414, 763-8

Saburi S, Azuma S, Sato E, et al., Developmental fate of single embryonic stem cells microinjected into 8-cell-stage mouse embryos. *Differentiation*, 1997, 62, 1-11

Shamblott M.J., Axelman J., Gaerhart J.D. et al., Derivation of pluripotent stem cells from cultured primordial germ cells, *Proc.Natl.Acad.Sci.US*, 1998, 95, 13726-31

Schamblott 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.US*, 2001, 98, 113-18

Schuldinger M., Yanuka O., Itskovitz-Eldor J. et al., Effects of 8 growth factors on the differentiation of ESC, *Proc. Natl. Acad. Sci US*, 2000, 97, 11307-312

Sevantes R.B., Stringer J.R., Shao C., et al., ESC and somatic cells differ in mutation frequency and type, *Proc.Natl.Acad.Sci.US*, 2002, in press.

Sheenan S.M., Tatsumi R., Temm-Grove C.J. et al., HGF is an autocrine growth factor for skeletal muscle satellite cells in vitro, [Muscle@Nerve](#), 2000, 23, 239-45

Schnabel C.A., Yacobs Y., Clearly M.L., HsaA9-mediated immortalization of myeloid progenitors requires functional interactions with TALE cofactors Pbs and Meis, *Oncogene*, 2000, 19, 608-16

Smith A.G., Embryo-derived Stem Cells: of Mice and Men, *Ann.Rev. Cell Dev. Biol.*, 2001, 17, 435-62

Smyth N., Vatansever H.S., Murray P. et al., Targeting of the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation, *J.Cell Biol.*, 1999, 144, 151-60

Soria B., Roche E., Berna G. et al., Insulin-secreting cells derived from ESC normalize glycemia in diabetic rats, *Diabetes*, 2000, 49, 157-62

Surani M.A., Parthenogenesis in Man, *Nature Genet.*, 1995, 11, 164-9.

Talbot N.C., Carrett W.M., Ultrastructure of ESC of the 8-day pig blastocyst before and after manipulation, *The Anat.Rec.*, 2001, 264, 101--13

Terskykh A., Easterday M., Linheng L. et al., From Hematopoiesis to neuropoiesis: evidences of overlapping genetic programme, *Proc.Natl.Acad.Sci.US*, 2001, 98, 7934-39

Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S. et al., Embryonic stem lines derived from human blastocyst, *Science*, 1998, 282, 1145-47

Toma J.G., Akhavan M., Fernandes K.J. et al., Isolation of adult multipotent stem cells from the dermis of mammalian skin, *Nature Cell.Biol.*, 2001, 9, 778-84

Toyoda M., Takayama H., Horiguchi N. Et al, Overexpression of HGF|SCF promotes vascularization and granulation tissue formation in vivo, FEBS Letters, 2001, 509, 95-100

Tremain N., Korkko J., Ibberson D. Et al., MicroSAGE analysis of 2353 expressed genes in a single cell derived colony of of human mesenchymal stem cells reveals mRNA of multiple cell lineages, Stem Cells, 2001, 19, 408-18

Tsutsumi S., Shimazu A., Miyazaki K. et al., Retention of multilineage potential of MSC during proliferation in response to bFGF, Biochem.Biophys.Res.Comms.,2001, 288, 413-19

Ueki T., Kaneda Y., Tsutsui H. Et al., HGF gene therapy of liver cirrhosis in rats, Nature Med., 1999, 5, 226-30

Voss T., Thomas T., Petrou P. et al., Taube Nuss - a novel gene essential for the survival of pluripotent cells of early mouse embryos, Developm., 2001,127, 5449-61

Xiong J.W., Battaglino R., Leahy A. et al., Large-scale screening for developmental genes in ESC, Devel.Dyn.,1998,212, 181-97

Xu C., Inokuma M.S., Denham J. et al., Feeder-free growth of undifferentiated human ESC, Nature Biotechnol.,2001, 19, 971-74

Yang J., Liu Y., Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by HGF prevents renal interstitial fibrosis, J. Am. Soc.Nephrol., 2002, 13, 96-107

Yen Y., Manova K., Benezra R., Each member if Id gene family exhibits an unique expression pattern in mouse gastrulation and neurogenesis, Dev.Dyn., 1997, 208, 92-106

Young H.E., Duplaa C., Young M. et al, Clonogenic analysis reveals reserve stem cell in postnatal mammala, Anat.Rec., 2001, 263, 350-360

Young H.E., Steele T..Bray R.A. et al, Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissue of sceletal muscle and dermis, The Anat Rec,2001, 264,51-62

Vieille I., Roullot V., Courtis G., Lineage and stage specific expression of Hox-1 gene in the human hemopoietic system, Biochem.Biophys.Res.Comms.,1992, 183, 1124-30

Wakayama T., Tabar V., Rodrigues I. et al., Differentiation of EC lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer, Science, 2001, 292, 740-43

Wakayama T., Rodrigues I., Perry A.C. et al., Mice cloned from embryonic stem cells, Proc.Natl.Acad.Sci.US, 1999, 98, 14984- 89



Wang S., Gaerhart J.D., Human pluripotent stem cells, *Pediatrics in Rev, NeoRev*, 2000, 1, e132-e136

Watt F.M., Hogan B. Out of Eden: Stem Cells and Their Niches, *Science*, 2000, 287, 1427-33

Wei G., Schubiger G., Harder F. et al., Stem cell plasticity in Mammals, *Stem cells*, 2000, 18, 409-19

Weiss M., Orkin S.D., In vitro differentiation of murine ESC, *J. Clin. Invest.*, 1996, 146., 591-96

Weissman I., Translating Stem and Progenitor Cell Biology to the Clinic: Barriers and Opportunities, *Science*, 2000, 287, 1442-1446

Wernig M., Brustle O., 50 ways to make a neuron: shifts in stem cell hierarchy and their implication for neuropathology and CNS repair, *J. Neuropathol..Exp.Neurol.*, 2002, 61, 101-10

Willing A.E., Cameron D.F., Sanberg P.R., Sertoli cell transplants: their use in the treatment of neurodegenerative disease, *Molecular Medicine ToDay*, 1998, 4, 471-77

Zimmerman F., Rich I.N., Mammalian Hox-B6 expression correlates with erythropoietin production and erythropoiesis, but not with isolated stem cell populations  
*Blood*, 1997, 89, 2723-35

Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H. et al., Multilineage lines from adult adipose tissue: implications for cell based therapy, *Tissue Eng.*, 2001, 7, 211-28

Zvafiler N., Marinova L., Adams G. et al., Mesenchymal precursors in the blood of normal individuals, *Arthritis Res.*, 2000., 2, 477-88

## ГЛАВА ВТОРАЯ

# Стволовые клетки в эмбриогенезе мозга млекопитающих

"Природа работает в любых масштабах, если она этого пожелает"

К. Бонне (1764 г)

### 1. Модели на стыке клеточной биологии и геномики

Истоки всех сил развития ЦНС изначально концентрируются в монослое нейроэктодермы зародыша. Начальный морфогенез мозга представляет диалог "soft-сигналов" с провизорными клетками нервной трубки, включающий скрытый латентный период преобразования soft-signals в новые молекулярные устройства и новый фенотип клеток. Программы меняют устройство клеток через набор транскрипционных факторов. Устройство клеток определяет их судьбу и функции. Эмбриогенез ЦНС – это многократный рост численности с одновременным кардинальным обновлением клеток. Одиночные стволовые клетки превращались в сеть прогениторных клеток, которые в ходе миграции дифференцировались в специализированные линии нейронов и глии. В ходе гаструляции монослой примитивной нейроэктодермы (эпибласта) превращается в три зародышевых листка: экто-, мезо- и эндодерму. Значительная часть первичной эктодермы трансформируется в нейроэктодерму - провизорный орган и временный банк основной массы некоммитированных стволовых клеток. Три зародышевых слоя генерируют плюрипотентные стволовые клетки. Образование эктодермы и мезодермы происходит *in vitro* из тотипотентных клеток тератокарциномы или ЭСК. Удаление из среды культивирования LIF и слоя фидера вело к остановке пролиферации. Постмитотические незрелые клетки дифференцировались в эмбрионидные тельца.

Варьируя комбинацией ростовых факторов/индукторов, направляли дифференцировку агрегатов ЭСК в сторону эктодермы или мезодермы. Хотя НСК удавалось получить из ЭСК в культуре, этот путь, как мы увидим, методически труден и пока работает лишь в микромасштабе. Вырастить нейросферы из клеток первичной нейроэктодермы пока также не удалось. В то же время культуру НСК получили практически без проблем из всех отделов развивающегося мозга. Интересен механизм роста клонов НСК. Прогениторные клетки, покидающие клон, подвергались рестрикционному созреванию. Часть клеток вне клона направленно мигрировала в развивающемся мозге. Незаменимую роль в миграции прогениторных клеток играла сеть радиальной глии (РГ), которая опережающе возникала из нейромезенхимы, а также стволовых клеток хориоидного сплетения. Большинство дефинитивных структур мозга млекопитающих и человека собрано из пришлых клеток.

Быстрый прогресс в методах выращивания ЭСК и НСК был обусловлен несколькими обстоятельствами. Во-первых, метод двойной рекомбинантной делеции (нокаута) материнской и отцовской аллели гена в ЭСК приоткрыл роль многих «ранних» генов органогенеза и нейруляции. С помощью *knockout*-мутаций составлена карта расположения главных генов на хромосомах, реестр их функций, место и время действия в нервной трубке, прозо- и ромбомерах. Во-вторых, пересадки стабильно меченых НСК/прогениторных клеток в мозг развивающихся зародышей дали метод количественного подсчета *founder cells* в коре, мозжечке, гиппокампе. С помощью меченых НСК составлена карта "миграции" клонов в растущем развивающемся мозге. В-третьих, культура эксплантатов помогла расшифровке эпигеномных механизмов нейрогенеза (индукция нервной пластинки, регионализация нервной трубки, селекция клеток апоптозом, направленная миграция прогениторных популяций, терминальная дифференцировка постмитотических клеток).

Стволовые клетки начинают все программы поэтапного развития мозга как у млекопитающих, так и у человека. *Software* созревания нейрональных стволовых клеток *in situ* и *in vitro* остается ключом к практическим целям, имея в виду направленную регенерацию поврежденного спинного и головного мозга.

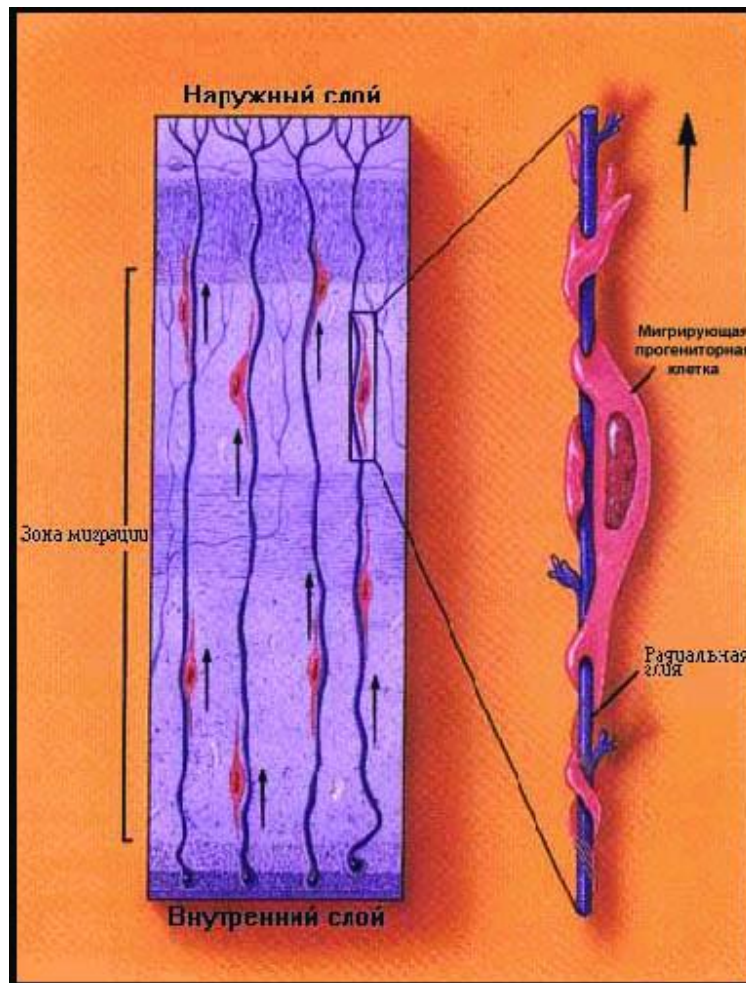
НСК мозга млекопитающих и человека характеризуются следующими особенностями: 1) возникают естественным путем в нервной трубке 2) имеют

"минимальный" белковый фенотип 3) делятся ассимметрично, либо симметрично в клонах 4) сохраняют потенцию к максимальному числу делений в незрелом состоянии 5) сохраняют плюрипотентность - способность дифференцироваться в любую специализированную линию нейронов, олигодендроцитов или астроглии 6) сохраняют мультипотентность в реципиентной ткани 7) сохраняют фенотипическую гетерогенность в разных отделах мозгах (в том числе к сигналам пролиферации и дифференцировки) 7) хорошо выживают в изолированной мозговой ткани при +4 C 8) Имеют ограниченный набор "маркерных" молекул для идентификации. Белковый репертуар и антигенный "профиль" НСК много беднее, чем нейронов и глии.

## **2. Нервная трубка - первоисточник провизорных стволовых клеток**

Подобно другим провизорным органам, нервная трубка является временнымместилищем стволовых клеток ЦНС. Нервная система зародыша человека возникает из трех областей нейроэктодермы: 1) нервной пластинки (ЦНС, соматические мотонейроны и преганглионарная часть вегетативной нервной системы) 2) клеток нервного гребня ( периферическая автономная нервная система) 3) эктодермальной плагоды (сенсорные ганглии краниальных нервов, гипофиз, нейроэпителии внутреннего уха и глаза). Процесс закладки и формирования нервной трубки протекает в несколько стадий. Сперва по краям нервной пластинки появляются мигрирующие нервные складки, которые, сливаясь по срединной линии, дают нервную трубку. Белковый продукт гомеозисного Sox-1 гена выявлялся в первичной нейроэктодерме, хотя мРНК всего семейства HMG-(high mobility group) X-хромосомы гораздо раньше накапливались в зрелых яйцеклетках и сохранялись в ранних зародышах. Белки-репрессоры Sox-генов контролируют плотную упаковку хроматина с удержанием плюрипотентности генома клеток нейроэктодермы (Vriz S., Joly C., Boulekbache H. et al., 1999 ). Sox-1, Sox-2, Sox-3 гены уже экспрессированы в нейроэктодерме на стадиях образования первых сомитов Второй парой генов, контролирующих плюрипотентность генома нейроэктодермы, являются Xdbx и Xash3. Избыточная экспрессия этой пары генов в нервной трубке вызывала остановку созревания и

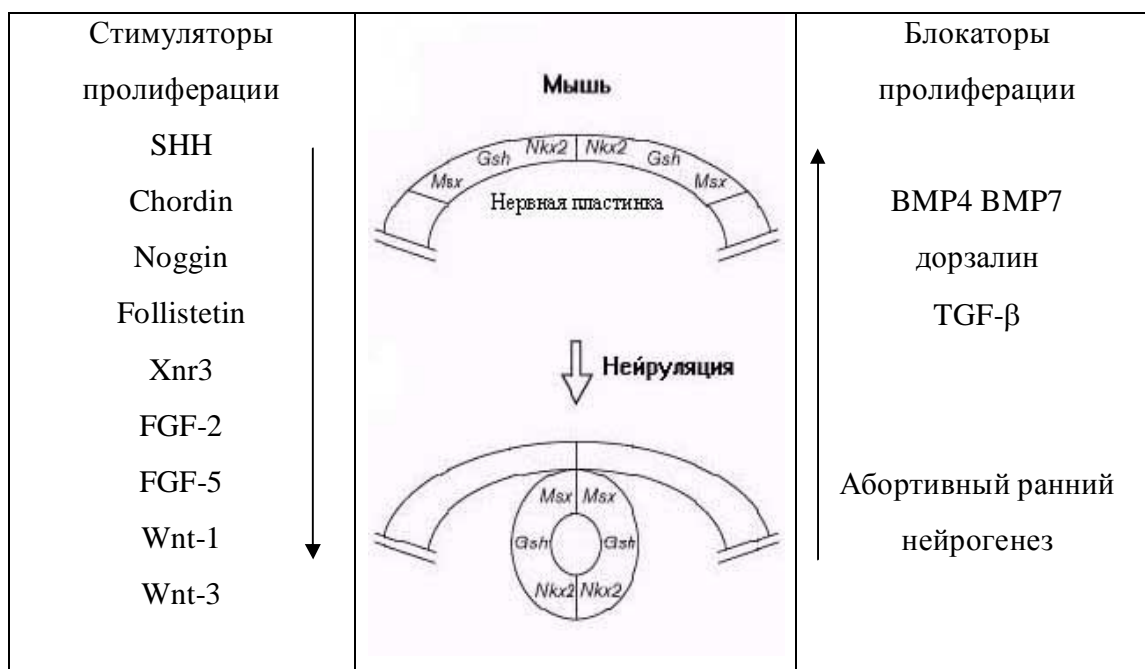
избыточную пролиферацию незрелых клеток. Продукты последних двух генов блокировали эктопический нейрогенез НСК после пересадки кусочков нейроэктодермы в мозг реципиентов (Gershon A.A., Ridnick J., Kalam L. et al., 2000). Семейство Zic- генов также экспрессировано в начале нейрогенеза. В дорзальной части нервной трубки экспрессированы мРНК Zic-1 гена. После закрытия нервной трубки Zic-1 ген экспрессирован в клетках нервного гребня, включая мигрирующие прогениторные популяции, покидающие гребень.



**Рис 2-1. Схема направленной миграции прогениторных клеток мозга эмбрионов по матриксу радиальной глии**

Рецепторы клеточной адгезии играли решающую роль в направленной миграции клеток нервной трубки. Передняя часть нервной трубки трансформировалась в головной мозг. Нервная трубка над нотохордой превращалась в спинной мозг. Первый прорыв был связан с расшифровкой механизма действия организатора, описанного в 20-х годах XX века Шпеманном и Мангольдтом. Трансплантация нотохорды перепела в эмбрион цыпленка вызывала образование дополнительной нервной трубки. Это подтвердило эквипотенциальность организатора у разных видов. Эктопический гомотрансплантат клеток с сильно экспрессированным геном *goosecoid* индуцировал образование второй оси развития зародыша, причем донорские клетки "навязывали" зародышу-реципиенту экстра-нейруляцию. Опыты доказали ключевую роль гена *goosecoid* в запуске нейруляции (Boncinelli E., Mallamaci A., 1995). На следующем этапе транскриптаза *goosecoid* запускала второй эшелон регуляторов. Секретируемые окружающей тканью белки *noggin*, *chordin*, *follistatin*, *Xnr3* инактивировали действие BMP-7/BMP-4, блокируя превращение плюрипотентной незрелой эктодермы в мезодерму. Стимуляторы нейруляции (FGF-2, FGF-5, Wnt1, Wnt3, Sonic Hedgehog - SHH-A) направляли созревание плюрипотентных клеток в линии нейронов/глии. Мутация SHH-/- блокировала сегментацию и образование прозомеров в передней части нервной трубки мышей. Избыточная экспрессия транскриптазы Wnt-1 вела к региональной экспансии незрелых клеточных масс.

Баланс концентрации противоположных по эффекту сигналов направлял созревание нейроэпителлия. Главным "вентральным" сигналом был белок SHH, секретируемый нотохордой. (Рис 2-2). Зародыши *Mash-1* -/- мышей погибали из-за тотального блока развития нервной трубки, нарушения созревания гранулярных клеток мозжечка, рецепторных клеток внутреннего уха, краниальных сенсорных нейронов, обонятельных нейронов, адренэргических нейронов базальных структур мозга и периферической нервной системы. У *Math1* -/- мышей было блокировано развитие гранулярных нейронов мозжечка и рецепторных нейронов внутреннего уха. Этот же ген, видимо, выключал созревание гранулярных клеток мозжечка и рецепторных клеток вестибулярного аппарата и внутреннего уха (Helms A.W., Abney A.L., Ben-Arie N. et al., 2000).

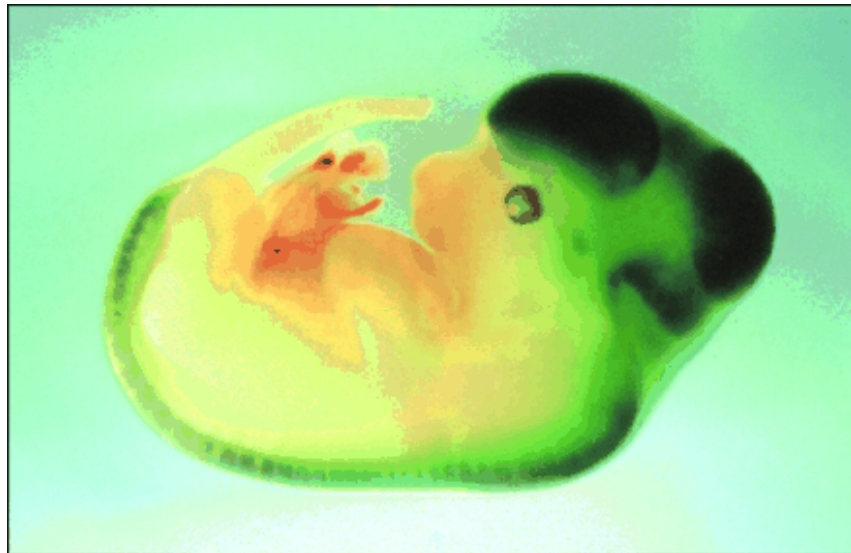


**Рис 2-2. Схема экспрессии генов нейруляции**

На больших расстояниях эффект SHH уравновешивался Gli3- транскриптазой. С дорзальной стороны эпидермис генерировал три сигнала - BMP-4, BMP-7 и дорзалин (дериват TGF-beta). Латеральная экспрессия Pax-3 и Pax-6 в мезодерме необходима для нормального развития нервной трубки. Pax-3/Pax-6 метят прогениторные пролиферирующие клетки. Замыкание нервной трубки завершало образование монослой нейроэпителия - эпендимы. У зародышей мышей *Lim1*<sup>-/-</sup> блокировано закрытие нервной трубки. *Noggin*, *chordin*, *follistatin* служили костимуляторами формирования нервной трубки. SHH множественными путями участвовал в нейруляции с разными группами плюрипотентных клеток. В ранних провизорных и стволовых клетках была выявлена изоформа SHH-A, которая напрямую связана с митотическим каскадом MAPK и с рецептором тирозиновой киназы RPTK (Conti L., Sipione S., Magrassi L. et al, 2001). В новорожденном мозге SHH-A локализован исключительно в герментативном слое ЦНС. В постмитотических нейронах идентифицирована другая изоформа –SHH-C. Активаторы цАМФ и протеинкиназы С

также стимулировали образование нервной трубки. Первичная нейруляция сопровождалась образованием нервного гребня из клеток нейромезенхимы .

В эпендиме/субэпендиме концентрировались главные пулы стволовых клеток нервной трубки, что верифицировано прокраской срезов развивающегося мозга мышей и крыс антителами к нестину. Количество нестин+ клеток (дериватов нейроэпителия трубки) экспоненциально нарастало по всем областям растущего мозга. Антитела к нестину окрашивали новообразованные клетки радиальной глии (РГ). Рост нестин+ клеточной массы визуально прослеживали на макросрезах головного мозга у трансгенных животных .



**Рис 2-3. Визуализация нестин+ стволовых/прогениторных клеток в головном и спинном мозге зародыша мыши 16 дня развития**

У трансгенных зародышей с вставленной конструкцией флуоресцентного GFP-белка под нестиновым промотером подавляющая часть светящихся клеток собрана вокруг перивентрикулярной области мозга. Слои GFP-окрашенных клеток радиально разрастались *in situ*, заполняя все быстро растущие области головного мозга. Зоны интенсивного роста состояли из клонов НСК, клетки которых делились и направленно



мигрировали в новые отделы и ядра мозга. (Рис. 2-3). На поздних стадиях созревания нейробластов градиент SHH достаточен для вентральной дифференцировки мотонейронов. С дорзальной стороны BMP-4, BMP-7 и дорзалин направляли дифференцировку сенсорных нейронов. В постнатальном периоде НСК сохранялись в эпендиме и субэпендимальном слое вокруг желудочков, а также в гиппокампе, обонятельной луковице, коре и других структурах (Dalstrand J., Lardelli M., Lendahl U., 1995).

Перивентрикулярная область взрослого мозга млекопитающих остается "реликтом" эмбрионального мозга с остатками стволовых ниш. В этих зонах сохранились гетерогенные популяции плюрипотентных клеток (Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., et al., 1999). Эти клетки *in situ* прокрашивались антителами к нестину, виментину, GFAP и Noggin. Локальные инъекции Noggin стимулировали разрастание перивентрикулярных клонов прогениторных клеток в мозге взрослых животных (Lim D.A., Tramontin A.D., Trevejo J.M. et al., 2000). Локальные инъекции bFGF, EGF стимулировали не только пролиферацию реципиентных, но и донорских НСК, трансплантированных в фетальный и постнатальный мозг млекопитающих (Abe K., Saito H., 2001; Fricker-Gates R.A., Winkler C., Kirik D. et al., 2000). Один из главных эффектов Noggin связан с нейтрализацией BMP-4. В мозге взрослых животных локальные концентрации эндогенных стимуляторов пролиферации, по-видимому, уравновешивались высокой концентрацией BMP-4 и BMP-7. Эти условия тормозили обновление нервных клеток в перивентрикулярной области мозга взрослых. Практически в каждом послеоперационном образце субвентрикулярной ткани взрослых людей выявляли мелкие и крупные нейросферы, окруженные плотным матриксом и слоем астроглии, которая окрашивалась антителами на GFAP. Авторы предположили, что глия вокруг нейросфер играет роль фидера, формирующего стволовую нишу (Kukekov V.G., Laywell E.D., Suslov O. et al, 1999).

Вторым источником стволовых клеток является эпендима хориоидных плексусов. Ранее предполагали, что региональные сосудистые сплетения выполняет лишь трофическую функцию, секретировав в ликвор все необходимые ростовые и поддерживающие факторы. Питание стволовых перивентрикулярных пространств осуществляется через ликвор со стороны эпендимы (Leventhal C., Rafii S., Rafii D., et al,

1999). Сосудистые сплетения эмбрионального мозга имеют множественные зоны пролиферирующего эпителия, напоминающие по фенотипу стволовые клетки (Коржевский Д.Е., 1999). У зародышей хориоидное сплетение играет роль поставщика нейральных стволовых клеток. Если нейроэпителий сплетения возникает из нервной трубки, то сосудистая мезенхима играет роль фидера, сохраняющего плюрипотентность НСК (Kitada M., Chakraborty S., Matsumoto N. et al., 2001). Эпендимальные клетки сосудистых сплетений были изолированы в культуру от так называемой «зеленой» трансгенной мыши, в которой ген флуоресцентного белка был поставлен под актиновый промотор. Практически это означало, что в культуре или после трансплантации клетки эпендимы светились флуоресцентной меткой. Исходные клетки эпендимы не прокрашивались антителами к виментину, нестину, GFAP, GLT-1, beta-tubulin III, MBP. После пересадки этих клеток в зону повреждения спинного мозга появлялись GFAP+, vimentin+ клетки, которые через 2-3 недели дифференцировались в типичные астроциты, но не нейроны. Часть НСК покидала сплетение и мигрировала в мозг (Catala M., 1998). Однако выделить НСК в виде клонов *in vitro* из ткани хориоидных сплетений пока не удалось (Gabrion J.B., Herbute S., Bouille C. et al., 1998). Третьим источником НСК является «реликты» нейроэпителия, сохраняющегося в спинном мозге. Такие ранние нейроэпителиальные клетки при плотности 100-300 клеток/мл росли суспензионными клонами (нейросферами) на бактериальных чашках (клоногенность = 1-2,5%) (Kalyani A., Hobson K., Rao M.S., 1997). Клетки дезагрегированных нейросфер прикреплялись к дну чашек, покрытых ламинином, и дифференцировались в нейроны, глию и олигодендроциты. Нейросферы пассировали в селективной среде с bFGF и EGF. В отличие от НСК мозга ранние нейроэпителиальные клетки спинного мозга культивировали и размножали в прикрепленном недифференцированном состоянии в минимальных плотностях в среде с bFGF + экстракт зародыша цыпленка. Часть прикрепленных клеток окрашивалась антителами к нестину, 1-5 % клеток окрашивались антителами к GFAP. Часть клеток принадлежала к стволовым/прогениторным клеткам нервного гребня. Из этих предшественников дифференцировались шванновские клетки и периферические нейроны при добавлении цАМФ, сыворотки в среде, содержащей EGF, bFGF, NGF (Kalyani A., Hobson K., Rao M.S., 1997). Пока не ясно, как обнаруженные особенности

профиля НСК в спинном мозге связаны с особенностями эмбриогенеза. Нервная трубка спинного мозга детерминирована генерировать только сенсорные и моторные нейроны. На примере прогениторных клеток спинного мозга разработана иерархическая схема дерепрессии генов эмбриогенезов по сегментам спинного мозга. В исходных незрелых прогениторных клетках функционируют 5 комплексов репрессии генома. Последовательная дерепрессия открывает лишь один из 5 возможных способов активации хроматина. К примеру, SHH-зависимая активация гена *Rax-6* открывает путь к дерепрессии только одного из 5 репрессоров второго эшелона – *Nkx2.2/2.9*. Первичная дерепрессия гена *Irx* вызывает селективную вторичную дереессию лишь *Olig2*. Селективная дерепрессия *Dlxb2* вызывает комплементарную дереессию *NKX6.1*, а *Dlxb1* активирует *Nkx6.2*. Такая сегментарно собранная сеть транскрипционных факторов позволяет в полуавтоматическом режиме обеспечивать сборку нервных сетей, собранных из мотонервных и сенсорных нейронов разного фенотипа. Исходно вся сеть собрана из общих ранних предшественников (Lee S.K., Pfaff S.L., 2001).

### **3. Стволовое пространство обонятельного нейроэпителлия**

Эпендима как орган регенерации мозга привлекла к себе внимание после исследований эмбриогенеза и регенерации спинного мозга рыб. У многих видов рыб выявлена высокая скорость обновляемости нервных клеток даже в зрелом периоде. В эпендиме постоянно образовывались новые клоны НСК, из которых клетки мигрировали в зоны повреждения головного и спинного мозга. Мозг певчих птиц оказался второй удачной моделью для изучения обновления стволовых пространств эпендимы. Мозг канареек, снегирей выделялся высокой скоростью обновления клеток (около 1.5% клеток подвергались смене каждые 24 часа у взрослых особей). Как правило, миграторные незрелые клетки теряли N-кадгерин. Исследования были облегчены открытием в прогениторных нейронах птиц РНК-связывающего белка *Hu*, который исчезал в зрелых постмитотических нейронах. С помощью антител к *Hu*-белку было показано, что первое поколение дочерних стволовых клеток оставались в

субэпендиме до 4-5 дней перед началом миграции. Этим регенерация взрослой мозговой ткани отличалась от нейрогенеза эмбрионов, у которых дочерние стволовые клетки немедленно покидали субэпендиму. Возможно, что лаг-фаза необходима для потери N-кадгерина. Антитела к нейрональному NCAM блокировали адгезию прогениторных клеток. Однако большинство новообразованных клеток располагались между субэпендимой желудочков и центром пения (дорзомедиальный неостриатум). НСК после деления оставались в субэпендиме, тогда как дочерние клетки экспрессировали рецепторы навигации и устремлялись в паренхиму высших отделов головного мозга. Прогениторные клетки мигрировали по специальным каналам, которые были выстланы слоем вытянутых глиальных клеток. Последние инкрустировали каналы миграции специальными белками, которые направляли миграцию незрелых клеток.

Обонятельный эпителий имел как правило трехслойную архитектуру. Апоикальный слой состоял из зрелых специализированных нейроэпителиальных клеток. Каждый зрелый нейрон имел лишь один тип обонятельного рецептора (ОР), экспрессированного на внешней поверхности плазматической мембраны сильно поляризованных клеток. Зрелый эпителий насчитывал до 1000 типов клеток, несущих разный рецептор. Зрелые нейроны определяли не только по положению, но маркерным рецепторам, включая белок OMP. Созревающие нейроны промежуточного фенотипа располагались ниже несколькими слоями. Еще ниже располагались пролиферирующие прогениторные слои клеток.

Сами стволовые клетки (НСК) покоятся на базальном слое эпителиальных клеток, распластанных монослоем вдоль базальной мембраны. В некоторых ямках сосредоточены скопления (колонии) НСК округлой формы. Клетки вокруг ямки экспрессировали мРНК для FGF-8. В отличие от более вытянутых прогениторных клеток, стволовые клетки не экспрессировали мРНК гена Mash-1. Однако клетки маркировались антителами к нестину. НСК также маркировались антителами к рецептору для EGF.

У мышей весь путь от переднего рога бокового желудочка до обонятельной луковицы был представлен слоями мигрирующих незрелых нейронов между слоями астроглии. Плотность нейронов примерно в 4 раза превышала плотность глии. Прогениторные

клетки мозжечка зародышей 11-12-й нед развития лишены “навигационной информации” . N- кадхерин-минус прогениторные клетки теряли способность к направленной миграции.

#### 4. Стволовое пространство эпендимы

У зародышей млекопитающих нейрональная трубка ( позднее -выстилка желудочков и субэпендимальный слой) являются главным поставщиком новых нейронов и глии. Долгое время считалось, что эти зоны продуцируют новые клетки только в развивающемся мозге. Однако следы эмбриональной ткани и эмбриональных процессов найдены у взрослых особей. Для идентификации S- прогениторных клеток в околожелудочковых пространствах вводили бромдезоксидин ( БУДР- аналог тимидина), который встраивается в синтезируемых моноклональных антител. При длительном мечении исследовали миграцию уему ДНК. Визуализацию БУДР+ клеток проводили с помощью флуоресцентно мече БУДР-меченых клеток в мозге. Этим метчиком удалось обнаружить сотни новообразованных клеток в субэпендимальном пространстве, в гиппокампе. В субвентрикулярной зоне появлялся один новый нейрон на 2000 клеток в сутки (нейроны возникали в 2 раза чаще, чем глиа). С помощью БДУР установили главные потоки миграции клеток в обонятельную луковицу, гиппокамп, gyrus dentatus. В случае повреждения головного или спинного мозга число регенерирующих предшественников в субэпендимальной зоне желудочков резко возрастало.

На первом этапе пришлось исключить возможность миграции “пришлых” СК через циркуляцию и pia mater. Если хирургически убрать агрегаты СК из субэпендимальных пространств, в самой эпендиме увеличивалось количество нестин-положительных клеток и быстро восстанавливались агрегаты нестин + клеток. Клетки по периферии агрегатов СК постепенно теряли нестин. Если клетки клонов были мечены DIL ( либо геном бета-галактозидазы), то спустя 10-15 дней меченые клетки выявлялись в

луковице обонятельного эпителия. Лишь большие концентрации метки давали надежные результаты .

Покоящиеся стволовые клетки, встроенные в монослой эпендимы, не имели рецептора к FGF-2. Делящиеся клоны экспрессировали рецептор для FGF-2. Внутрижелудочковое введение FGF-2 эмбрионам 16-18 дня гестации приводило к бурной пролиферации нестин+ клеток в перивентрикулярной области, которое завершалось появлением новых порций клеток в коре больших полушарий, обонятельной луковице и гиппокампе. При введении тех же доз FGF-2 в желудочки мозга взрослых животных наблюдали волну пролиферации стволовых клеток в эпендиме/субэпендиме без усиления пролиферации и численности клеток в коре больших полушарий (Vaccarino F.M., Ganat Y., Zhang Y. et al., 2001)

Сам монослой эпендимы практически не включал БУДР. К субэпендиме прилегают скопления гетерогенных популяций. Мелкие довольно плотно упакованные кластеры клеток включали БУДР. Вокруг этих кластеров располагались более крупные вытянутые клетки с мигрирующей ламеллой. Этот слой клеток имел рецепторы для FGF-2, EGF, TGF-alpha. Мигрирующие предшественники нейронов не имели миелиновой оболочки. Lois и Alvarez-Buylla на мышах доказали миграцию нейрональных предшественников из субвентрикулярной зоны мозга крыс в эпителий луковицы обонятельного эпителия мышей. Миграцию предшественников визуализировали с помощью меченых антител к нестину и белку-транспортеру 2 (переносчик медиаторов-моноаминов). В этой же лаборатории было показано, что донорские меченые НСК, вводимые в субвентрикулярную область 15-дневных зародышей мышей, давали многочисленные клоны клеток, которые мигрировали, пролиферировали и стабильно заселяли практически все отделы растущего мозга по главным осям роста и клеточной экспансии мозговой ткани зародыша (Lim D.A., Fishell G.J., Alvarez-Buylla A., 1997) . Образование новых популяций клеток в субэпендиме особенно хорошо изучено в мозге певчих птиц (канареек). По уровню обменяемости клеток в зоне пения головной мозг этих птиц более напоминает костный мозг и эпидермис кожи. Вытянутые глиальные клетки микроокружения сооружали “рельса и колеса” для направленной миграции новообразованных прогениторных клеток. Антитела к глиальному фибриллярному белку, N-кадхерину,

виментину частично блокировали миграцию клеток. Сама миграция поддерживалась градиентом сигналов (IGF-1, IGF-2, TGF-beta, BDNF, NT-3, NTB). Показательно, что в цикле обновления нейронов за счет пула НСК в мозге взрослых животных играют эндогенные «минорные» ростовые факторы, особенно IGF1 и IGF2. В культуре эти функции факторов обновления пока не удастся воспроизвести, а уж тем более изучить (Brooker G., Kalloniatis M., Russo V. Et al., 2000) Klas Johansson из Королевского института в Стокгольме подтвердил, что главным источником НСК является внутренняя выстилка желудочков. Количество НСК в эпендиме увеличивалось в 50 раз при повреждении спинного мозга. Изолированные *in vitro* НСК формировали нейросферы. Клетки кластеров дифференцировались в нейроны, астроциты и олигодендроциты. НСК мигрировали даже в зоны повреждения спинного мозга.

## **5. Клональная дисперсия стволовых клеток мозга**

4 способа маркировки клеток ранних зародышей млекопитающих использовали для проверки клональной гипотезы закладки мозга : 1) трансгенные животные с маркерными НСК (*lacZ*, GFP) 2) пересадки донорских меченых ЭСК в бластоцисту 3) смешивание маркированных ЭСК с клетками морулы 4) внутриматочное введение меченых донорских НСК/прогениторных клеток в ткани зародыша после гастрюляции.

Первые доказательства клонального устройства нервной трубки были получены на трансгенных зародышах крыс, в клетках которых ген тирозиназы был поставлен под промотор нестина или виментина - ранних генов нейроэпителия. В результате трансплантированные клетки нейроэктодермы и нервной трубки синтезировали тирозиназу. Эти клетки легко визуализировались на срезах ткани зародыша. Окраска срезов нервной трубки на тирозиназу выявила кластерное распределение покрашенных клеток (Tief K., Schmidt A., Aguzzi A. et al, 1996).

Пересаженные донорские стволовые клетки не только выживали, но размножались автономными ростками в зародышах-реципиентах. Доля химеризации

мозга, кожи, других органов существенно колебалась (от 5% до 60%). Причины вариабельности плохо изучены. Часть донорских НСК формировала кластеры в местах закладки ядер мозговой ткани. Из этих первичных центров меченые клетки мигрировали радиально в верхние слои мозга, либо перемещались горизонтально вдоль формирующихся слоев. Иногда ЭСК химеризовали активной средним мозгом, кору зародышей мышей и крыс, не достигая базальных структур мозга и мозжечка. Зубчатая фасция гиппокампа чаще других структур химеризовалась донорскими ЭСК. Кора обоих полушарий головного мозга мышей и крыс с равной эффективностью заселялась донорскими НСК. Миграторные популяции, покидающие клоны, перемещались на значительные расстояния, достигая дефинитивных структур (Куан С.У., Elliot E.A., Rakic P., 1997). С помощью пересадок НСК подсчитано, что вся популяция клеток Пуркинье в мозжечке возникает из 15-20 founder-cells, которые давали примерно 100-110 начальных клонов. Эти клоны формировали всю паренхиму будущего органа (Howkes R., Faulkner-Jones D., Tam P. et al., 1998). По другим данным, не менее 80 founder-cells участвовало в закладке мозжечка (Mathos L., Bonnerot C., Puelles L. et al., 1997). Пересадки донорских НСК в мозг зародышей выявили несколько закономерностей: 1) донорские НСК *in situ* размножались клонами. 2) сигналы микроокружения с высокой эффективностью контролировали как численность клеток, так и профиль созревания *in situ*. 3) пересадки никогда не приводили к "аномалиям" дифференцировки стволовых клеток. В региональных структурах мозга всегда возникало лимитированное количество нейронов/глии местного функционального профиля. 4) не наблюдали ошибок дифференцировки при пересадке стволовых клеток в мозг зародышей/взрослых, что сделало эту технологию особо привлекательной для практической медицины. Близкие данные были получены с НСК, мечеными геном LacZ (бета-галактозидазой кишечной палочки). Пролиферация меченых клеток-доноров преимущественно осуществлялась клонами (Mathis L., Nicolas J.F., 2000).

## **6. Регионализация и сегментация нервной трубки**



Закладка telencephalon у млекопитающих контролируется парой генов *Otx1* и *Otx2*. Эти уникальные консервативные гены млекопитающих практически не эволюционировали и эквивалентны гену *orthodenticle (otd)*, контролирующему развитие переднего отдела головы дрозофилы. Мыши с двойным нокаутом *Otx1*<sup>-/-</sup> имели дефекты органов чувств, сенсорных систем мозга, эндокринные расстройства, развивали эпилепсию. *Otx2*<sup>-/-</sup> мыши погибали внутриутробно от аномалий развития переднего мозга. Поразительно, что пересадки в мозг *Otx1*<sup>-/-</sup> или *Otx2*<sup>-/-</sup> мышей гена *Otd* дрозофилы восстанавливали нарушенный эмбриогенез и утраченные функции переднего мозга (Acampora D., Gulisano M., Broccoli V. et al., 2001). Ген дрозофилы полностью замещал функции утраченного *Otx*-гена млекопитающих! Третий ген семейства *Otx* связан с закладкой гипоталамуса и нейро-эндокринных линий базального мозга. *Otx3*<sup>-/-</sup> мыши погибали вскоре после рождения из-за полного отсутствия релизинг-факторов и нейропептидных гормонов гипоталамуса (Wang W., Lufkin T., 2000). Нейро-мезенхимальные взаимодействия особенно существенны на начальных фазах развития telencephalon. Нейроэпителий переднего мозга утолщается, инвагинируя в подлежащую мезенхиму с образованием обонятельных ямок (позднее обонятельной луковицы). Ретиноевая кислота, SHH, FGF-8, BMP-4 опосредовали этот процесс. Нох-гены не принимали участие в закладке и сегментации обонятельной луковицы. Мигрирующие популяции клеток нервного гребня (НГ) составляли часть мезенхимы, формирующей обонятельную луковицу. Мутации гена *Rax-6*, повреждающие миграцию клеток НГ в зачаток обонятельной луковицы, приводили к аномалиям развития переднего мозга (LaMantia A.S., Bhasin N., Rhodes K. et al, 2000). Первичные культуры telencephalon 13.5 - дневных зародышей крыс использовали для изучения последовательности экспрессии второго эшелона Нох-генов. В популяции прогениторных клеток (селективно выращенных с помощью bFGF) были экспрессированы гены *Otx1*, *Otx2*, *Dlx1*, *Dlx2*, *Dlx5*, *Emx1*. Если *Otx1*, *Otx2* маркировали популяцию некоммутированных прогениторных клеток, то *Dlx* /*Emx* маркировали постмитотические бластные линии, вступившие на путь рестрикционного созревания (Robel L., Ding M., James A.J., 1995). Пролиферацию части прогениторных клеток telencephalon контролировал FGF-8. Далее эти клетки экспрессировали BF-1 (ростовой фактор наработки клеточной массы) и *Dlx2* для развития вентральных

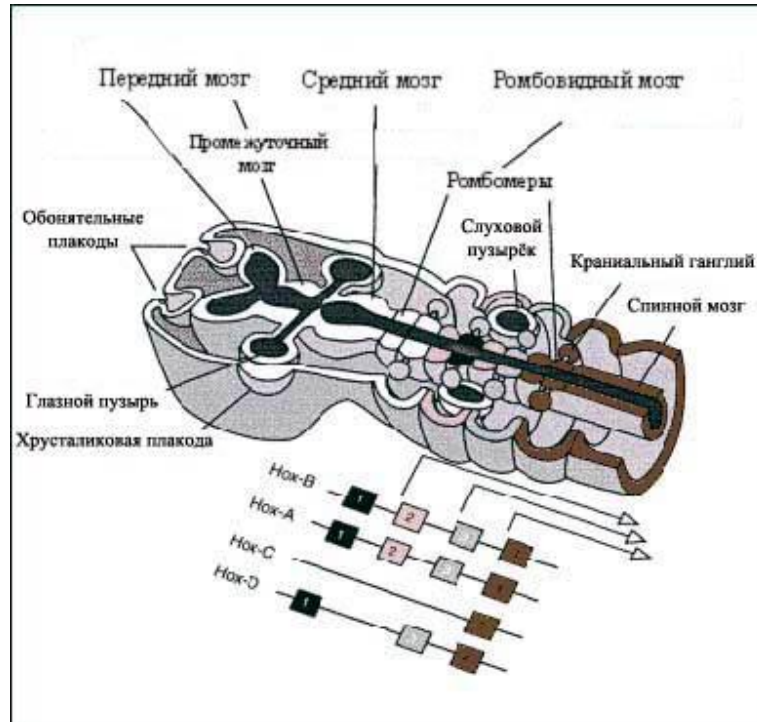
отделов telencephalon. Гомеозисный ген *Vax1* контролировал развитие таламуса и визуальной системы (Hallonet M., Hollemann T., Pieler T. et al., 1999). Баланс гена-стимулятора (*Vax1*) и генов-репрессоров (*Pax-6*, *Rx*) задавал численность нейронов в разных отделах зрительной системы.

Гены гомеозиса (Нох-гены) разделяли территорию нервной трубки клонами некоммутированных клеток, реализующих разные soft-программы. Так, экспрессия Нох-генов маркировала границы шести прозомеров передней части трубки и семи парных ромбомеров задней части нервной трубки. Трехмерная "разбивка" территории нервной трубки устроена более сложно и зависит от множества сигналов. Сперва клетки на ранних стадиях формирования ромбомеров и прозомеров свободно мигрировали в соседние участки нервной трубки. Ограничения на миграцию возникали на более поздних стадиях развития ромбомеров. Первым барьером, намечавшим границы сегментов, был лиганд *Ephrin* и комплементарный ему *Eph*-рецептор. Клетки нейроэпителия по закону случая имели на своей поверхности либо лиганд, либо *Eph*-рецептор. Далее силы размежевания выстраивали вдоль границ ромбомеров слой клеток с лигандом против слоя клеток с рецептором (Wilkinson D.C., 2001). Данные о вкладе Нох-генов в эмбриогенез мозга получены в основном на *knockout*-мышях. У человека описана пока лишь одна мутация *NoxD13* гена, вызывавшая полидактилию верхних и нижних конечностей.

Все 170 Нох-генов контролируют пространственные сборки зародышевых клеток первично на уровне многокомпонентных транскрипционных комплексов, куда включены не только транскриптазы, но и многочисленные кофакторы транскрипции. Поскольку кофакторы не только активируют, но и ингибируют транскрипцию, Нох-гены одновременно тормозят экспрессию «старых» генов, активируя экспрессию «новых» генов морфогенеза. Большинство мРНК Нох-генов предсинтезированы уже в созревающей яйцеклетке и предимплантационных зародышах (включая человека) (Kuliev A., Kucharenko V., Verlinsky Y. et al, 1996).

Преформированный набор мРНК сохранялся в зародыше к началу гастрюляции и нейруляции. Предобразованные мРНК многих Нох-генов выявлены на стадии регионализации нервной пластинки млекопитающих (Altmann C.R., Brivanlou A.H., 2001). 39 Нох-генов кластеризовано в 4 семейства: НохА, НохВ, НохС и НохD. Эти

гены экспрессируются как в трех зародышевых листках, так и мезенхиме. Мутации или делеции *Hoxd3*, *Hox-B4*, *Hox-d9*, *Hox-d-11* приводили к тяжелым аномалиям скелета. Парная делеция *Hox-a2*, *Hox-a3* генов вызывала аномалии развития мышц, костно-мышечной системы лица, шеи, аномалии развития тимуса, щитовидной железы (в силу аномалий развития ромбомеров и региональных дефектов нервного гребня).



**Рис 2-4. Схема действия Нох-генов в мозге зародыша млекопитающих**

Зародыши мыши *Lim1*<sup>-/-</sup> погибали на 10-й день из-за летальных дефектов развития переднего мозга. Закладка ромбомеров заднего мозга и экспрессия *Krox-20* при этом происходила нормально, что подтверждало независимость программы развития переднего и заднего мозга. Поскольку морфогенез мозга зависит от набора активных *Нох*-генов, это затрудняло установление вклада каждого гомеотического белка в развитие ЦНС. В ромбомерах заднего отдела мозга экспрессировались транскриптазы *GATA-2*, *GATA-3* в субвентрикулярных слоях трубки, где локализованы НСК. Эти же *Нох*-гены экспрессируются в гематогенных стволовых клетках (Nardelli J., Thiesson D., Fujiwara Y. et al., 1999). Профиль активированных

мРНК Нох-генов на уровне одиночных ромбомеров зародыша различен. Селекция инструкций на языке мРНК направляла формообразование в разных ромбомерах заднего мозга (Kato K., O'Dowd D.K., Fraser S.E. et al., 1997). Вторым эшелонем «регион»-сигналов трубки служили продукты гена SHH, Wnt-1, nodal и lefty, а также bFGF, BMP/GDF. Семейство генов HH состоит из трех главных генов, участвующих в регионализации ЦНС, скелетных мышц, краниофациальных структур и желудочно-кишечного тракта. В ЦНС преобладали эффекты SHH (sonic hedgehog) на общую численность и распределение региональных стволовых клеток. В других закладках регионализацию контролировали indian HH (IHH) или desert HH (DHH). Эффекты HH опосредовались двумя рецепторными трансмембранными комплексами - Patched (PTCH) и Smoothed (SMO) (Oldakr M., Grzela T., Lazartchuk M. et al., 2001). В постэмбриональном периоде эти гены контролировали общее количество региональных стволовых клеток в эпителии и костном мозге. У трансгенных зародышей мышей с двойной дозой SHH в нервной трубке число прогениторных клеток в клонах НСК спинного мозга увеличено в 2-3 раз (Rowitch D.H., S-Jaques D., Lee S.M., 1999). У мышей SHH<sup>-/-</sup> возникала ранняя атрофия и недоразвитие скелетных мышц из-за резкого уменьшения численности пролиферирующих прогениторных клеток в мышечных клонах (Kruger M., Mennerich D., Fees S., et al., 2001).

Транскриптаза Wnt-1 многократно разными путями контролировала сегментацию нервной трубки. Внутриклеточной мишенью действия Wnt-1 служит бета-катенин. Комбинируясь с разными коактиваторами, бета-катенин подключает к экспрессии новые Нох-гены. Комбинациями цитоплазматических сигналов запускается экспрессия новых Нох-генов. Модифицированные новыми белками Нох-транскрипционные комплексы направляли трехмерный рост клонов в нейромерах, ромбомерах и других обособленных территориях нервной трубки. Принято думать, что комбинации Нох-генов транслируются в направленный трехмерный рост клонов и разную численность новообразованных клеток. Рельеф доменов транскрипционных комплексов опознает "рельеф" хроматина стволовых/прогениторных клеток. Коды молекулярных соответствий переводят линейную информацию "гомеотических" генов

в 3D-пролиферацию, миграцию прогениторных клеток в растущих клонах переднего, среднего и заднего мозга зародыша.

Растущий клон остается главной мишенью действия следующей батареи Нох-генов. В каждом клоне есть вентро-дорзальная и латеральная ось, вокруг которых работают градиенты продуктов Нох-генов. Появление белков Neurogenin 1 (Ngn1) и Neurogenin 2 (Ngn2) с дорзальной стороны, как и белка Mash1 с вентральной стороны нервной трубки, коррелировало с появлением первых прогениторных популяций. С этого момента доля нестин+ клеток в провизорной нервной трубке снижалась. Нокаут гена Ngn1<sup>-/-</sup> или Ngn2<sup>-/-</sup> компенсаторно увеличивал долю Mash1<sup>+</sup> клеток в нервной ткани зародышей мышей. Баланс Ngn1+Ngn2 / Mash-1 направлял нейрогенез сенсорных/моторных нейронов спинного мозга, вентральной и дорзальной части среднего и заднего мозга. Действуя с дорзальной стороны, нейрогенины контролировали численность чувствительных нейронов, тогда как Mash-1 стимулировал созревание моторных нейронов. Сверхэкспрессия Ngn1/Ngn2 в прогениторных клетках вызывала избыточное образование нейронов не только в нервной трубке, но и в мезодерме. Нейрогенез дорзального таламуса контролировали Ngn1, Ngn2, тогда как нейрогенез вентральной части таламуса был под контролем Mash1. Далее в вентральной части нервной трубки появлялись мРНК генов семейства Nkx (Nkx 6.1, Nkx 2.2). Баланс экспрессии Mash1/Ngn направлял потоки нейро/глиогенеза в коре больших полушарий (Nieto M., Schuurmans C., Britz O, et al, 2001). У Mash1<sup>-/-</sup> эмбрионов мышей полностью блокировано образование нейронов (но не глии) в коре больших полушарий. Прогениторные клетки с экспрессией генов Mash-1 и Prox-1 теряли нестин.

Для вентро-дорзального рестрикционного созревания баланс Mash-1+ Prox-1/ Ngn1+ Ngn2 предопределял долевою численность разных линий нейронов в ЦНС (Kaibushi K., Nakamura S., Casarosa S. et al.,1999).

Отдельного рассмотрения заслуживают взаимодействия прогениторных клеток по «тандему» рецепторов Delta-Notch. Notch был открыт при изучении эмбриогенеза дрозофилы. Мутации Notch контролировали оогенез, миогенез, нейрогенез, развитие крыльев и глаза. У млекопитающих идентифицированы 4 варианта гена: Notch1-4. В нейрогенезе участвует Notch 1 и 2. Delta является внешним мембранным лигандом.

Клетки с экспонированным Delta избирательно взаимодействуют с Notch рецептором других прогениторных клеток. Эта пара рецепторов стабилизирует клон за счет контактов прогениторных клеток между слоями. Эти взаимодействия, стабилизирующие клон, одновременно тормозили нейрогенез. Delta – Notch контакты прогениторных клеток в нейросферах ингибировали экспрессию нейрогенинов и Mash1, стимулируя пролиферацию. Показательно, что в растущих нейросферах эмбрионального мозга экспрессирован ген Notch-1, тогда как в растущих нейросферах постнатального мозга экспрессирован ген Notch-2. Этот маркер различал первичные и вторичные нейросферы (Higuchi M., Kiyama H., Hayakawa T. et al, 1995). Если Notch стимулировал образование новых прогениторных клеток в развивающейся ЦНС, то ген Numb отвечал за генерацию новых клонов и появление клон-инициирующих клеток. Выключение гена Numb приводило к гибели зародышей мыши на стадии 10,5-12 дня развития из-за дефектов формирования головной части нервной трубки и ускоренной генерации зрелых нейронов (Zhong W., Jiang M.M., Schonemann M.D. et al., 2000). Поэтому предположили, что градиент экспрессии Notch/Numb контролировал число прогениторных слоев в нейросферах и фазу перехода клона к постмитотическому созреванию (Rao M., Mattson M.P., 2001) В эпидермисе кожи человека взаимодействия Delta - Notch-1 также обеспечивали массивную экспансию прогениторных слоев клона (Lowell S., Jones P., Le Roux et al., 2000). В гематогенных клонах взаимодействия Delta 1,2,3 - Notch, либо Jagged -1,2 - Notch контролировали средние размеры колоний *in vitro*. Взаимодействие Delta / Notch заканчивалось протеолизом цитоплазматического домена Notch. Последний транспортировался в ядро, где связывался с транскрипционным комплексом Rb1-J (Schroeder T, Just U., 2000). Notch рецептор, активированный лигандом, одновременно снижал апоптоз прогениторных клеток (Han W., Ye Q, Morre M.A., 1999). Сигнализация через Delta/Notch в прогениторных клетках сопряжена с экспрессией фактора плюрипотентности Hes-1, который блокировал преждевременное включение генов Mash-1, Ngn1 Ngn2. И одновременно поддерживал уровень нестин+ и виментин+ клеток в клонах (Yuki N., Sakakibura S., Takaki M. et al., 2000).

В растущей скелетной мышце эмбрионов мышей комплексы Delta - Notch стимулировали пролиферацию некоммутированных предшественников миоцитов

путем экспрессии гена *Hes-1*, подавляющего экспрессию гена миогенина и *MyoD* (Kuroda K., Tani S., Tamura K. et al., 1999). Мутации гена *Notch* вызывали аномалии сегментации сомитов у *lunatic fringe* мышей. В растущих Т-клонах, как и миелоидных клонах, *Delta-Notch* контролировал экспансию прогениторных популяций (Haysay A.C., Barber D.F., Douglas N. et al., 2000 ; Tan-Pertel H.T., Walker L., Bowning D., 2000).

Нервная плакода у зародышей млекопитающих остается наиболее древней тканью, где рекордно высока плотность *Delta-Notch* взаимодействий в кластерах прогениторных клеток. В интенсивно обновляющихся клонах обонятельной плакоды активированы оба фактора плюрипотентности *HES-1* и *HES-5*. В клетках нейроэпителия плакоды экспрессирован только *HES-1*. Пока экспрессирован *HES-1*, невозможна экспрессия *Mash-1*, т.е. количество будущих нейробластов не определено в данном регионе. Пока в ткани доминировал фактор плюрипотентности *HES-1*, в клонах преобладала *Delta-Notch* зависимая пролиферация прогениторных клеток. Если *HES-1* клоны определяли общую территорию, занимаемую клетками обонятельного эпителия, то ген *HES-5* контролировал региональную плотность клеток (Cau E., Gradwohl G., Casasosa S. et al., 2000). В тканях мезодермы *HES-7* регулировал наработку *Delta-Notch* прогениторных клеток, т.е. основную массу будущих мышц (Bessho Y., Miyoshi G., Sakata R. et al., 2001). Мутации (делеции) *HES* -генов, как правило, вели к уменьшению размеров органов эмбрионов за счет ранней, ускоренной дифференцировки прогениторных клеток и укорочения цикла *HES-Delta-Notch* (Kageyama R., Ohtsuka T. et al., 1999). Сам механизм размножения клонов в разных отделах головного и спинного мозга оставался неизменным, хотя пролиферация прогениторных клеток контролировалась сменными *Hes*- репрессорами (Ohtsuka T., Ishibashi M., Gradwohl G. et al., 1999). В цикле созревания предшественников олигодендроцитов экспрессия гена *Hes-5* определяла максимальную наработку прогениторных клеток без Т3 рецептора. Выключение *Hes-5* переключало клон на наработку *Mash+* прогениторных популяций, экспрессирующих Т3 рецептор. В свою очередь Т3 запускал терминальную постмитотическую дифференцировку олигодендроцитов (Kondo T., Raff M., 2000).

В ходе дифференцировки островков Лангерганса из СК дуктулярного эпителия клоны эндодермальных прогениторных клеток экспрессировали триаду генов:

Delta/Notch - Math- Ngn3. На втором этапе в клетках-предшественниках островков Лангерганса включался новый набор рестрикционных сигналов: Isl-1, Brn-4, Pax-6, PDX1, Nkx6, Nkx2.2 (Schwitzgebel V.M., Scheel D.W., Connors J.R. et al., 2000).

Внутрижелудочковая имплантация эмбрионам НСК, трансфицированных Notch геном, вызывала образование радиальной глии (РГ) из клеток трансплантата. (Gaiano N., Nye J.S., Fishell G. et al., 2000). Ген Pax-6 играет незаменимую роль в закладке и развитии среднего мозга, особенно таламуса. У Pax<sup>-6/-</sup> мышей (Seu/Seu) наблюдалась микрофтальмия и недоразвитие вентральных отделов зрительного бугра. Пересадки нормальных стволовых клеток мозга мышей в развивающиеся зародыши Seu/Seu компенсировали дефект за счет новых связей между нейронами таламуса и коры (Pratt T., Vitalis T., Warren N. et al., 2000). Пересадки нормальных донорских клеток восстанавливали экспрессию генов Nkx2.2 и Lim1/Lhx1 в вентральном таламусе. На границе среднего и заднего мозга экспрессировалось максимальное число Нох-генов: Eng-1, Eng-2, Pax-2, Pax-5, Pax-8, Pax (zf-b). Каудальнее будущего истмуса экспрессировалась другая пара генов - Wnt-1 и FGF-8. Позднее в участке трубки, кодирующей структуры заднего мозга, экспрессировались гены Eng-1 и Eng-2, участвующие в закладке мозжечка. Мутации Eng-1<sup>-/-</sup>, Eng-2<sup>-/-</sup>, FGF-8<sup>-/-</sup> вели к остановке развития заднего мозга и гибели зародышей мышей. Нокаут Wnt-1<sup>-/-</sup> у мышей приводил к тяжелым аномалиям развития среднего мозга. Предполагается, что ген Wnt-1 контролирует транскриптазу, которая каскадным механизмом активирует Eng-1 и Eng-2 (Danelian P.S., McMahon A.P., 1996). Развитие мозжечка включало 4 этапа. Первые Нох-гены (особенно Eng-1) размечали территорию будущего органа. На втором этапе в ромбовидной губе возникали клоны-предшественники гранулярного слоя клеток и основных ядер. Продукт гена SHH контролировал пролиферацию прогениторных клеток гранулярного слоя. Эффекты SHH частично нейтрализовались действием bFGF, либо активацией протеинкиназы А. На третьем этапе формировались основные слои мозжечка, в том числе шла миграция клеток в гранулярный слой. Секретируемый прогениторными клетками белок нетрин1 и комплементарный рецептор Unc5h3 контролируют направленную миграцию клеток как за счет сил хемопривлечения, так и хемоотталкивания (repulsion). Одна изоформа рецептора заставляет клетки мигрировать по градиенту нетрина1, тогда как другой вариант



рецептора заставляет клетки избегать лиганда. Повреждение рецептора Unc5h3 или выключение гена нетрина1 приводяли к летальным аномалиям архитектоники клеток мозжечка ( Przyborski S., Knowles B., Ackerman S.,1998). Важную роль играют также два навигационных рецептора - CD10 и leu-4(CD3), которые селективным взаимодействием организуют локомоцию предшественников по волокнам Бергманновской глии (Gerloff C., Knoth R., Volk B.,1993). После рождения завершалась миграция клеток Пуркинье в гранулярный слой и заканчивалось формирование функциональных связей в нервной сети (синаптогенез).

Регулируемый сигналами апоптоз прогениторных клеток селектировал клетки для будущих сетей. До 10-го дня беременности в мозге отсутствовали погибающие клетки. На 14-й день развития до 70% прогениторных клеток элиминировались апоптозом. К 18-му дню число погибающих клеток в головном мозге снижалось до 50%. Даже в постнатальном периоде уровень репаративной обновляемости мозга остается очень высоким, поскольку 60-70% внутриутробных мозговых травм и кровоизлияний полностью компенсируется в постнатальном периоде ( Snyder E.Y., 1992). Этот же метод выявлял лишь единичные гибнущие клетки в мозге взрослой мыши ( Blaschke A.J., Staley K., Chun J., 1996). Высокий уровень апоптоза был связан с высоким уровнем сменяемости клеток клонов НСК.

## **7. Первичный нейро - и глиогенез**

Источником клонообразующих стволовых клеток нервной трубки служили два слоя: монослой нейроэпителия и субэпендимы. Идентификация первоисточников клеток *in situ* осложнялась множеством методических затруднений, поскольку отсутствовали надежные, однозначные маркеры НСК. Чаще всего выделяли в культуру гетерогенную популяцию незрелых клеток с варьирующим фенотипом. Наиболее важными признаками были способность НСК расти клонами в культуре и дифференцироваться в нейроны и глию после остановки пролиферации и добавления индукторов дифференцировки. Региональную принадлежность клонов удалось установить по второму эшелону Нох-генов, которые включались после завершения сегментации и формирования основных отделов мозга. В середине эмбриогенеза развивающийся

мозг зародыша мыши состоял в основном из самообновляющихся нейрофер и радиальной глии. Пролиферирующие нейробласты появлялись в головном мозге 13-дневных зародышей (у человека на 51-й день развития). Они организованно мигрировали на периферию. Среди Нох- генов обнаружены ключевые регуляторы (master genes), направляющие рестрикционную дифференцировку будущих линий нейронов. Так, Phox-2 ген контролировал дифференцировку нейробластов в адренэргические нейроны. У Phox-2<sup>-/-</sup> мышей полностью выключена экспрессия генов тирозингидроксилазы и допамин-гидроксилазы (Pattyn A., Goridis C., Brunet J.F., 2000). BMP-2 служил главным индуктором экспрессии Phox-2a и Phox-2b генов в Mash<sup>+</sup> прогениторных клетках. Некоторые Нох-гены маркировали миграторные популяции нейронов. Известно, что гипоталамус сформирован в основном за счет пришлых клеток. Нейроны, продуцирующие релизинг факторы, мигрировали сюда из вомероназальной области. Экспрессия гена Brn-2 связана с "навигационной информацией" мигрирующих клеток. Мыши Brn2<sup>-/-</sup> утрачивали способность формировать ядра гипоталамуса (Schonemann M.D., Ryan A.K., McEvelly R.J. et al, 1995).

Клональный характер закладки и развития стриатум вытекал из анализа динамики экспрессии гена Islet-1, представляющего семейство LIM- факторов транскрипции (второй эшелон Нох-генов, определяющих направление созревания прогениторных клеток после фазы пролиферации). В дорзальной части стриатум Isl-1<sup>+</sup> клетки практически отсутствовали. Зато их численность резко нарастала в средней и особенно вентральной части органа. Максимальное количество Isl-1<sup>+</sup> клеток в стриатуме у эмбрионов крыс определяли на 18-20-й день гестации, позднее их численность резко шла на убыль. Эта транскриптаза детерминировала появление холинэргических нейронов (Wang H., Liu F., 1999)

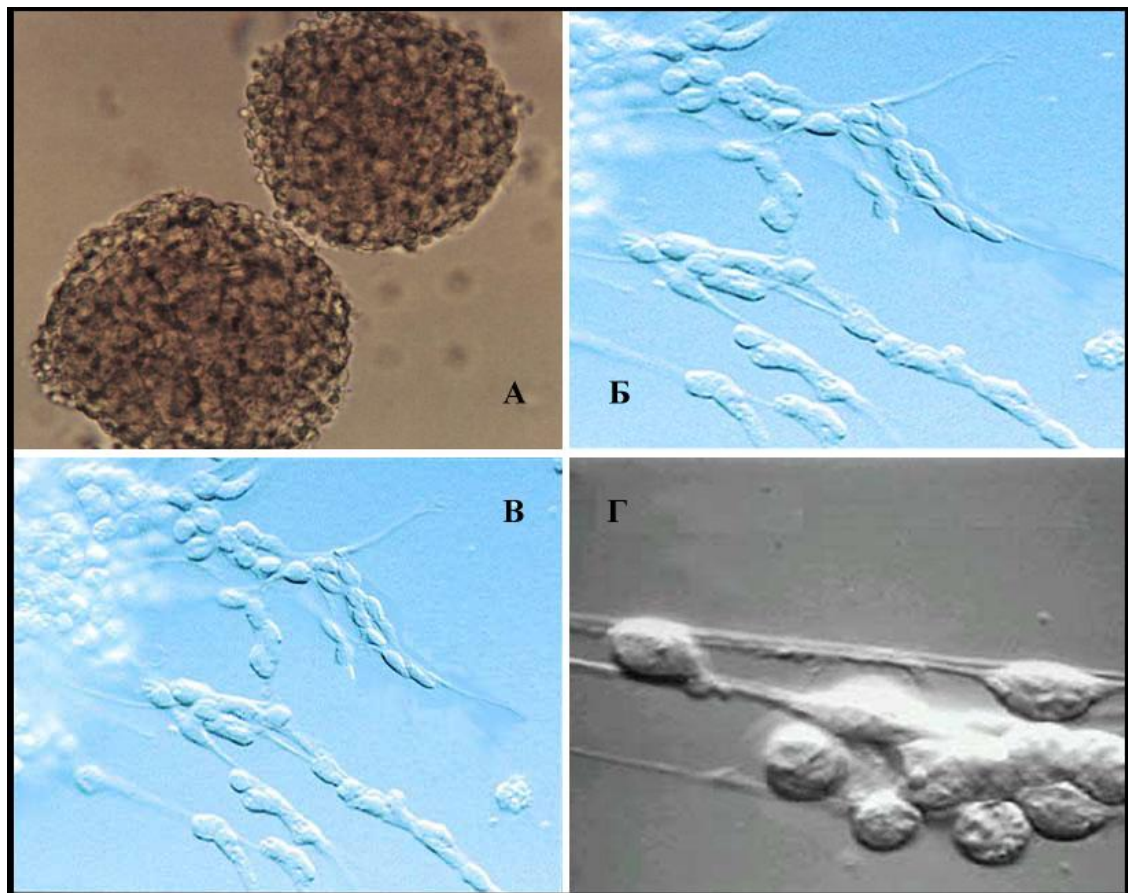
В том же стриатуме комбинация Brn-4, IGF-1, BDNF запускала терминальную дифференцировку постмитотических нейробластов. Продукты генов Brn-1, Brn-2 не влияли на созревание этой группы нейронов (Schimazaki T., Arsenjevic Y., Ryan A.K. et al., 1999). Образование специализированных нервных линий *in situ*, как правило, контролировалось комбинаторикой 4-5 генов. Исключение составляет дифференцировка холинэргических нейронов *in vitro* и *in situ*, которая контролировалась BMP-9 ( Lopez-Coviela I., Bersa B., Krauss R., 2000).

Внутрижелудочковая инъекция BMP-9 14- и 16-дневным зародышам мыши вела к резкому увеличению холинэргических нейронов мозга на последних сроках пренатальной жизни и в постнатальном периоде.

Некоторые из упомянутых генов контролировали созревание соматических линий в других органах. Например, сдвоенная нокаут-мутация *MyoD*<sup>-/-</sup>/*Myf5*<sup>-/-</sup> вела к полной остановке развития всех групп скелетных мышц. Мутация *Rax-6*<sup>-/-</sup> вела к полной остановке развития глаз. Мутация *SCL*<sup>-/-</sup> блокировала созревание всех ростков кроветворения. В ЦНС не обнаружено ни одного гена, селективное выключение которого вызывало полную остановку рестрикционного созревания всех линий нейронов. Так, мутация гена *Mash1*<sup>-/-</sup> мозаично блокировала созревание линий нейронов обонятельной луковицы, сенсорных нейронов спинного мозга, а также части нейронов ганглиев симпатической НС. Нокаут мутация гена *Math*<sup>-/-</sup> приводила к частичному блоку созревания нейронов гранулярного слоя в мозжечке. Созревание олигодендроцитов обеспечено наиболее сложной программой. В пролиферирующих предшественниках олигодендроцитов экспрессированы *Sox-10* (контроль плюрипотентности) и две транскриптазы *Olig-1* и *Olig-2*. В таком режиме прогениторные клетки длительно размножались. Следующий этап созревания был связан с включением блока POU -генов *Tst-1/Oct6/SCIP*, которые на третьем этапе запускали экспрессию генов *Vrn-1* и *Vrn-2*. На заключительной стадии созревания постмитотических клеток включался гомео-Нох-ген *Gtx/Nkx6.2* (Wegner M., 2001). Дефицит миелинпродуцирующих клеток человека для лечения демиелинизирующих заболеваний заставил искать пути лабораторной наработки олигодендроцитов и шванновских клеток из НСК и стволовых клеток нервного гребня соответственно. Налажено получение предшественников олигодендроцитов из нейросфер, выделенных из фетальной мозговой ткани (Zhang S., Ge B., Duncan J.D., 2000). Состав среды для дифференцировки предшественников олигодендроцитов из нейросфер или диспергированных одиночных клеток запатентован. Предшественники идентифицировали фенотипически по белку O4 и рецептору для PDGF.

## **8. Направленная миграция прогениторных клеток: взаимодействие с радиальной глией**

Во время развития нервной трубки радиальная глия (РГ) опережающе возникала из клеток хориоидного сплетения, которые затем мигрировали внутрь нервной трубки. Биполярные клетки РГ устроены асимметрично: перивентрикулярный отросток биполярной клетки, обращенный к эпендиме, обычно укорочен. Противоположный отросток пронизывает всю толщу нервной трубки (растущего мозга) (Chanas-Sacre G., Rogister B., Moonen G. et al., 2000). В растущем мозжечке РГ получила название Бергмановской глии, она служила "рельсами" для миграции клеток Пуркинье к клеткам внутреннего гранулярного слоя. В отличие от РГ остального мозга, которая исчезает в постнатальном периоде, Бергмановская глия функционирует в постнатальном периоде, когда завершается формирование архитектуры клеточных слоев мозжечка. После завершения миграции нейронов РГ трансформировалась в астроглию. Помимо характерной морфологии, маркерами РГ служили виментин (белок промежуточных нейрофиламентов) и RC2-белок, принимающий участие в транспорте липидов. Специфический контакт РГ с прогениторными клетками опосредовался белком межклеточных узнаваний - астротактином. Нейрегулин (GGF) ускорял миграцию прогениторных клеток вдоль тяжелой РГ (Anton E.S., Marchionni M.A., Lee K.F. et al., 1997). Установлено, что клетки РГ имеют более сложный генез, чем ранее предполагалось. Наиболее ранние порции РГ возникали из стволовых клеток сосудистых сплетений *ria mater*, мигрирующих в растущую нейропаренхиму. Вторая часть РГ возникала из НСК нейроэктодермы. Третья часть РГ появлялась из клеток нервного гребня и нейромезенхимы (Hartfuss E., Galli R., Heins N. et al, 2001). В коре зародыша часть НСК служила временным источником РГ. В постнатальном периоде клетки РГ превращались в астроглию, реже –нейроны (Noctor S.C., Flint A.C., Weissman T.A. et al., 2001). По этой причине глубокие клеточные слои возникали первыми, тогда как самые поверхностные слои клеток формировались последними. В эпендиме и перивентрикулярной области стволовые пространства используют ликвор в качестве "поддерживающей" среды для выживания. В растущем мозге эмбриона формировались так называемые "мобильные стволовые ниши", когда прогениторные клетки в комплексе с клетками растущих сосудистых сплетений в синергизме осваивали новые клеточные пространства.



**Рис 2-5. Формирование мобильных кластеров НСК/прогениторных клеток на тяжах РГ в культуре ( А- нейросферы в суспензионной культуре, Б,В – тяжи радиальной глии с одиночными мигрирующими прогениторными клетками, Г - участок радиальной глии с мигрирующим кластером прогениторных клеток).**

Гипертрофия ядер таламуса мозга человека связана с расширением клеточной сигнализации с фронтальной корой. Этот феномен отсутствовал в онтогенезе мозга лабораторных млекопитающих и приматов. Исследования Rakic показали, что крупные ядра дорзального таламуса возникали не за счет локальной пролиферации, а путем миграции прогениторных клеток из ganglionic eminence развивающегося мозга. Смешанное культивирование эксплантата ganglionic eminence зародыша человека с эксплантатом дорзального таламуса мыши не приводило к миграции прогениторных клеток человека в таламус мыши ( Rao Y., Wu J.Y., 2001)

В гиппокампе взрослых животных новые порции прогениторных клеток мигрировали на растущих капиллярах (РГ к тому времени превращалась в астроциты).

Мигрирующие прогениторные клетки распределялись кластерами на монослое эндотелия (Palmer T.D., Willhoite A.R., Gage F., 2000).

Пролиферация и миграция прогениторных клеток - главный феномен, ответственный за быстрый рост мозговой ткани зародыша. В мозговом сегменте нервной трубки человека миграция прогениторных клеток начиналась после первого месяца гестации и в основном завершалась в постнатальном периоде (Rakic P., 2000).

В мозге эмбриона выделяли два потока мигрирующих прогениторных клеток: 1) радиальный (тангенциальный) по "монорельсам" РГ 2) горизонтальный вдоль клеточных слоев. Соотношение клеточных потоков по радиальному/горизонтальному пути варьировало от 1/9 до 1/4 (Chanas-Sacre G., Rogister B., Moonen G. et al., 2000).

Мутации белка *geelin* у мышей вели к тяжелым нервным расстройствам, обусловленным нарушением архитектоники клеточных слоев в коре больших полушарий и других структурах мозга. Этот белок регулировал время и место покидания прогениторными клетками РГ. Мутации по липопротеидным рецепторам (VLDLR и apo ER2) приводили к сходным нарушениям направленной миграции прогениторных клеток и нарушениям архитектоники клеточных слоев (Rakic C., 2000). Алкоголь, действуя на мозг зародыша, разрушал образование РГ. Помимо алкоголя, некоторые мутации вызвали тяжелые аномалии миграции прогениторных популяций в мозговой паренхиме

Клоногенная культура НСК/прогениторных клеток, полученная из фетального мозга или мозга эмбрионов млекопитающих, моделировала направленную миграцию прогениторных клеток по остову РГ. Если выращенную в селективной ростовой среде суспензию нейросфер поместить в новую среду, содержащую малые концентрации сыворотки с добавлением BMP-4, наблюдали формирование вытянутых тяжей биполярных клеток, к поверхности которых прикреплялись кластеры нестин+ или виментин+ клеток (Рис 2-5).

В дальнейшем наблюдали миграцию прогениторных клеток вдоль тяжей РГ. Клетки РГ окрашивались виментином, кадхерином-11, часть клеток фиксировала антитела к GFAP и к поверхностному антигену RC2. Направленную миграцию к зонам повреждения демонстрировали и гематогенные стволовые CD34+ клетки, трансплантированные в мозг взрослых мышей. Для удобства визуализации,

гематогенные стволовые клетки были помечены цветным белком GFP. Трансплантированные клетки формировали кластеры прогениторных клеток в ткани мозга (Ono K, Takii T, Onozaki K. et al., 1999).

## **9. Нейрональные стволовые клетки *in vitro***

Терминология и главные характеристики НСК существенно зависели от способов выделения, молекулярной идентификации и функциональных тестов. В культуре НСК вели себя как самообновляющиеся в клонах незрелые плюрипотентные клетки с набором селективных фенотипических признаков. После остановки пролиферации они дифференцировались в нейроны, глию и олигодендроциты (Price J., Williams B., 2001). При этом потенция к трансдифференцировке НСК *in vivo* в случае их пересадок животным был всегда больше, чем их потенциал *in vitro*. Сигналы микроокружения в ткани играли решающую роль в судьбе трансплантированных клеток.

В 1990 г австралийские биологи во главе с Перри Бартлеттом впервые предложили метод селективного выделения клоногенной культуры НСК из мозга эмбрионов и взрослых животных. С помощью бессывороточной среды, содержащей LIF, bFGF и другие кофакторы, удалось на первом этапе культивирования избавиться от более продвинутых примесных клеток (Murphy M., Drago J., Bartlett P.F., 1990). Это был решающий методический успех, поскольку смешанное культивирование НСК и дифференцированных клеток вело к быстрой гибели, либо спонтанной дифференцировке НСК. Эта группа первой описала особенности роста и дифференцировки суспензионных клонов НСК/прогениторных клеток, а также первой получила иммортализованную линию НСК мышей с помощью трансфекции онкогена *c-myc* (Bartlett P.F., Reid H.H., Bailey K.A. et al, 1988). В отличие от "природных" НСК, иммортализованные с помощью онкогенов линии стволовых клеток переставали расти клонами. Через два года Reynolds и Weiss использовали близкий подход для выделения суспензионной клоногенной культуры НСК, добавляя в среду сразу два ростовых фактора (EGF, bFGF). Характеристики полученных культур, особенности

роста клонов НСК в главном совпали с результатами Бартлетта (Reynolds B.A., Weiss S., 1992). В 1994 г. Davis и Temple первыми количественно и качественно охарактеризовали клоны НСК, выделенные из мозга эмбрионов крыс. Лишь 7% клонов быстро обновлялись, продуцируя более 60 % всех клеток культуры. Около 40 % клеток в клонах составляли некоммитированные плюрипотентные клетки, которые в специальных условиях дифференцировались в нейроны, астроглию или олигодендроциты. Выращивая клетки в максимальных разведениях, удалось подсчитать примерное число клон-иницирующих клеток. Все клонообразующие клетки экспрессировали нестин - белок промежуточных филаментов нейроэпителлия. Характерно, что все клоны НСК с максимальной скоростью обновления прогениторных клеток имели максимальный уровень экспрессии мРНК гена *Hes-1* – главного фактора плюрипотентности НСК (Nakamura Y., Sakakibara S., Miyata N., 2000). Экспрессия гена *Hes-1* связана с самообновляемостью плюрипотентных клеток в нейросферах. Путем механического разбивания нейросфер, авторам удалось получить вторую и третью генерацию колоний. Клетки клонов после трех пассажей сохраняли плюрипотентность. Авторы выявили гетерогенность клеток нейросфер по чувствительности к ростовым факторам. Цитокины BMP-2 и BMP-4 вызывали дифференцировку прогениторных незрелых клеток в нейроны *in vitro*.

Природная гетерогенность клеток в нейросферах, изолированных из эмбрионального мозга млекопитающих, была отмечена в первых же работах. Маркерные молекулы нейроэпителлия (виментин, нестин, polysyalated-NCAM, GFAP, CD133 и др.) прокрашивали разные субпопуляции клеток нейросфер (Ushida N., Buck D.W., Weismann I.L. et al., 2000). В нейросферах из фетального мозга человека антитела к нестину и CD133 прокрашивали до 30-50% клеток. Как известно, CD133 является маркером гематогенных стволовых клеток. Некоторые культуры НСК удалось пассировать без онкомодификации (только на комбинации ростовых факторов в течение 2-3 лет) (Zhou F.C., Chiang Y.H., 1998). Доля клонов в культуре широко варьировала (0,1%- 25% в расчете на общую численность клеток) (Hulspas R., Quesenberry P.J., 2000). С помощью набора ростовых факторов (bFGF, SCF, EGF, LIF, ILGF-1) и своевременной дезагрегации удалось поддерживать и размножать клоногенную культуру плюрипотентных НСК в течение 1-3 лет без утери основных



биологических характеристик незрелых плюрипотентных клеток (Carpenter M.K., Cui X., Hu Z., et al., 1999; Kallos M.S., Behie L.A., 1999; Kallos M.S., Behie L.A., Vescovi A.L., 1999). Добавление к среде культивирования LIF (20-50 нг/мл) уменьшало время удвоения клеточной массы с 25-30 до 10 дней (Carpenter M., патент США No6103530). Такие длительно пассируемые культуры НСК не только сохраняли фенотип, плюрипотентность *in vitro*, но и уникальную способность направленно мигрировать, находить участки поврежденной ткани, интегрироваться в дефект нейронной сети *in situ*. В ряде случаев это приводило к полному/частичному восстановлению утраченной функции ЦНС (Rubio F.J., Bueno C., Villa A. et al, 2000). Первыми в онтогенезе мозга млекопитающих появляются так называемые f-нейросферы, пролиферация которых зависит только от bFGF. На более поздних стадиях развития появляются e-f-нейросферы, пролиферация которых более зависима от EGF, чем от bFGF (Ciccolini, 2001).

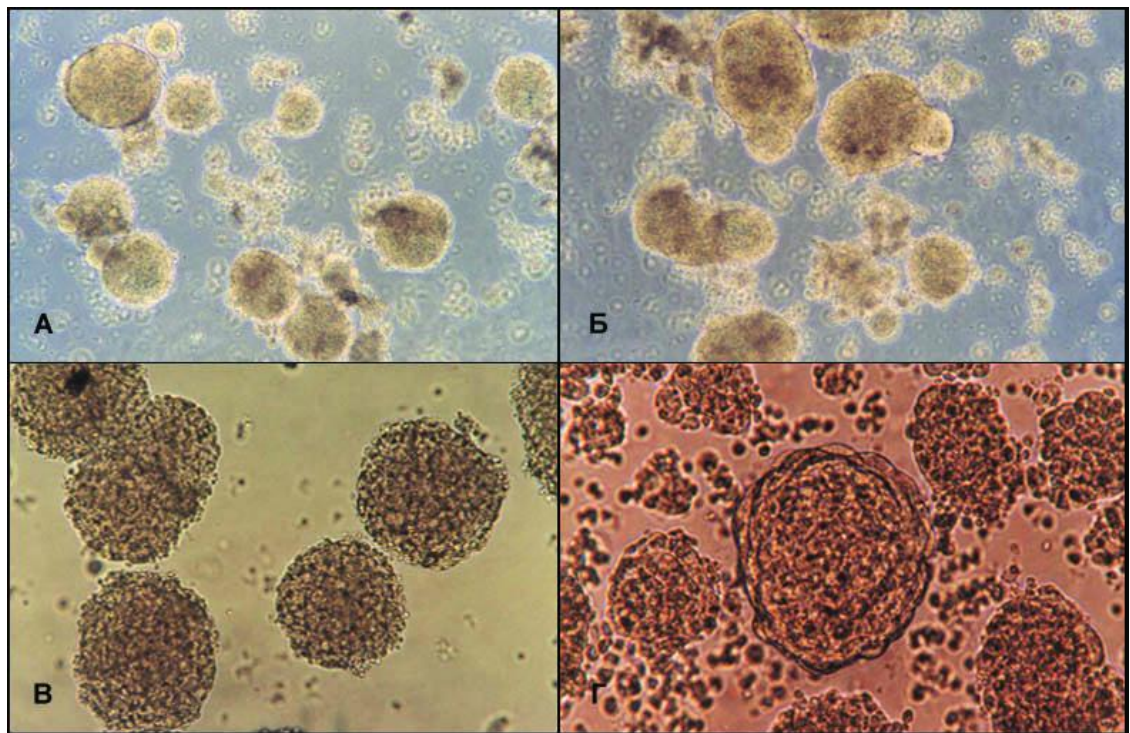
Из эмбрионального и взрослого мозга человека выделяли клоногенную культуру НСК с фенотипом астроглии (Laywell E.D., Rakic P., Kukekov V.G. et al., 2000). Около 5-7% свежеизолированных нейросфер содержали Notch1+ прогениторные клетки. Эти же авторы выделяли жизнеспособные нейросферы из длительно хранившейся нервной ткани (4-6 дней при +4 C).

НСК с фенотипом астроглии (GFAP+ клетки) чаще всего локализованы в субэпендимальном слое желудочков. При изолировании и культивировании до 60% НСК/прогениторных клеток из перивентрикулярной зоны мозга элиминируются апоптозом (Levinson S.W., Rothstein R.P., Brazel C.Y. et al., 2000). Низкие цифры жизнеспособности клеток в первичной культуре или пассажах могут быть связаны с присутствием нейросфер с высокой скоростью обновления клеток. Не только фетальная мозговая ткань может быть источником НСК. Кора больших полушарий постнатального мозга является богатым источником нейросфер и прогениторных популяций, инициирующих образование клонов в культуре (Mehler M.F., Gokhan S., 1999). Даже хирургические биоптаты позволили регулярно изолировать НСК из мозга оперированных людей любой возрастной группы (Kukekov V.G., Laywell E.D., Suslov O. Et al., 1999). Отработана методика сортировки нейросфер по фенотипу с последующим изучением "профиля" мРНК с помощью ПЦР. Метод позволил

сопоставить наборы мРНК в нейросферах разного фенотипа или разного происхождения (Suslov O.N., Kukekov V.G., Laywell E.D. et al., 2000). По нашим

данным, нейросферы, выделенные из фетальной мозговой ткани 8-12 нед и 17-21 нед гестации, характеризовались весьма выраженной морфологической гетерогенностью (средними размерами клонов и формой клеток в клонах), гетерогенностью иммунофенотипа (варьирующим процентом нестин+, виментин+, N-кадхерин+, кадхерин-11+, NCAM+, GFAP+ клеток в разных клонах).

В культуре процент примеси более продвинутых клеток в изолированных нейросферах не превышал 1-2% (по уровню CD34+, МНСI, МНСII + клеток) (Ржанинова А.А., Репин В.С. и др., 2001).



**Рис 2-6. Гетерогенность клонов НСК из фетального мозга**

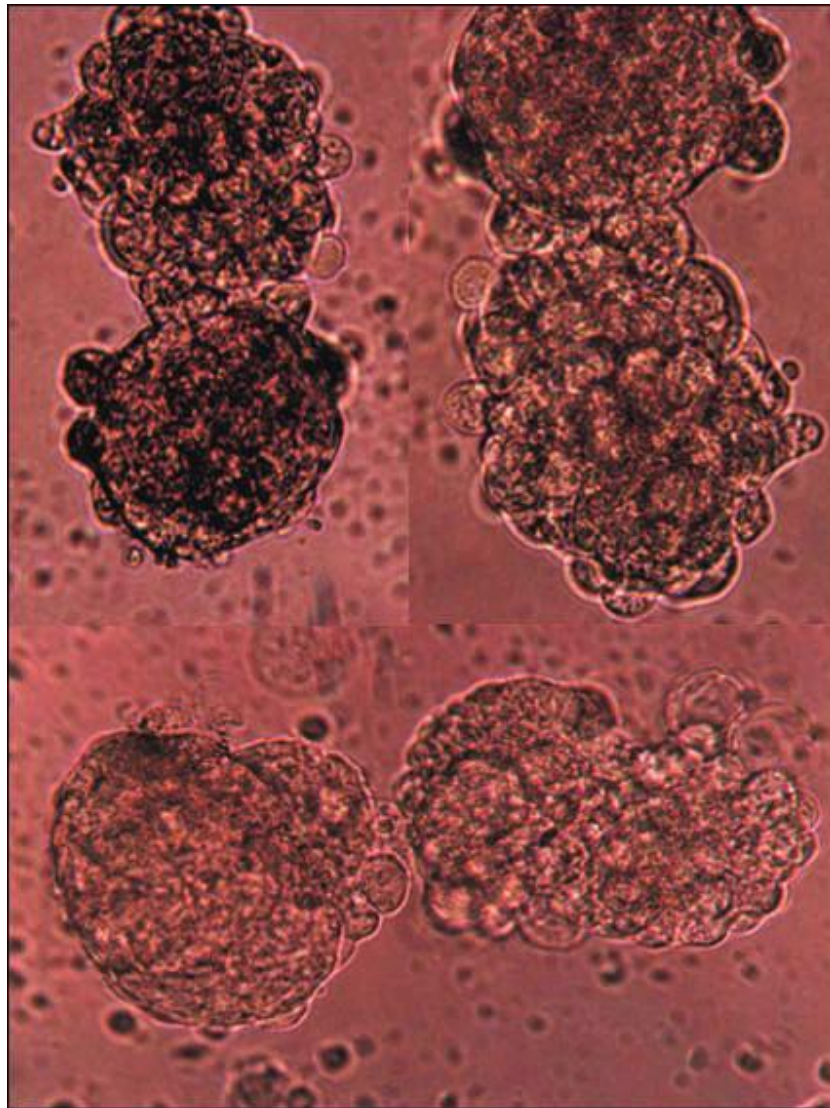
На всех фотографиях заметна морфологическая гетерогенность клонов, по форме и упаковке клеток в клонах.

Количество нестин+, виментин+, кадхерин11+ , GFAP+ клеток сильно варьировало в первичной суспензионной культуре и трех первых пассажах. Относительная доля указанных маркеров не изменялась существенно при пассировании и колебалась в пределах 5-25%. Ни в одной первичной культуре нейросфер не наблюдали превалирования монофенотипа до уровня 40-60% от всех

клеток нейросфер. Этот постоянный полиморфизм подтверждал «пластичность»  
нейросфер, собранных

из разных нейроэктодермальных и нейромезенхимальных плюрипотентных клеток. Возможно это природное разнообразие прогениторных клеток с разным набором мРНК и фенотипических маркеров обеспечивает плюрипотентность клона, которая всегда больше, чем одна линия НСК. Пока не ясно, как реализуется это преимущество в эмбриогенезе мозга. Однако «репертуар» НСК максимален в развивающемся мозге человека.

При длительном культивировании и в пассажах наблюдали отпочковывание новых клонов из старых, а не только рост клонов за счет экспансии периферических слоев прогениторных клеток.

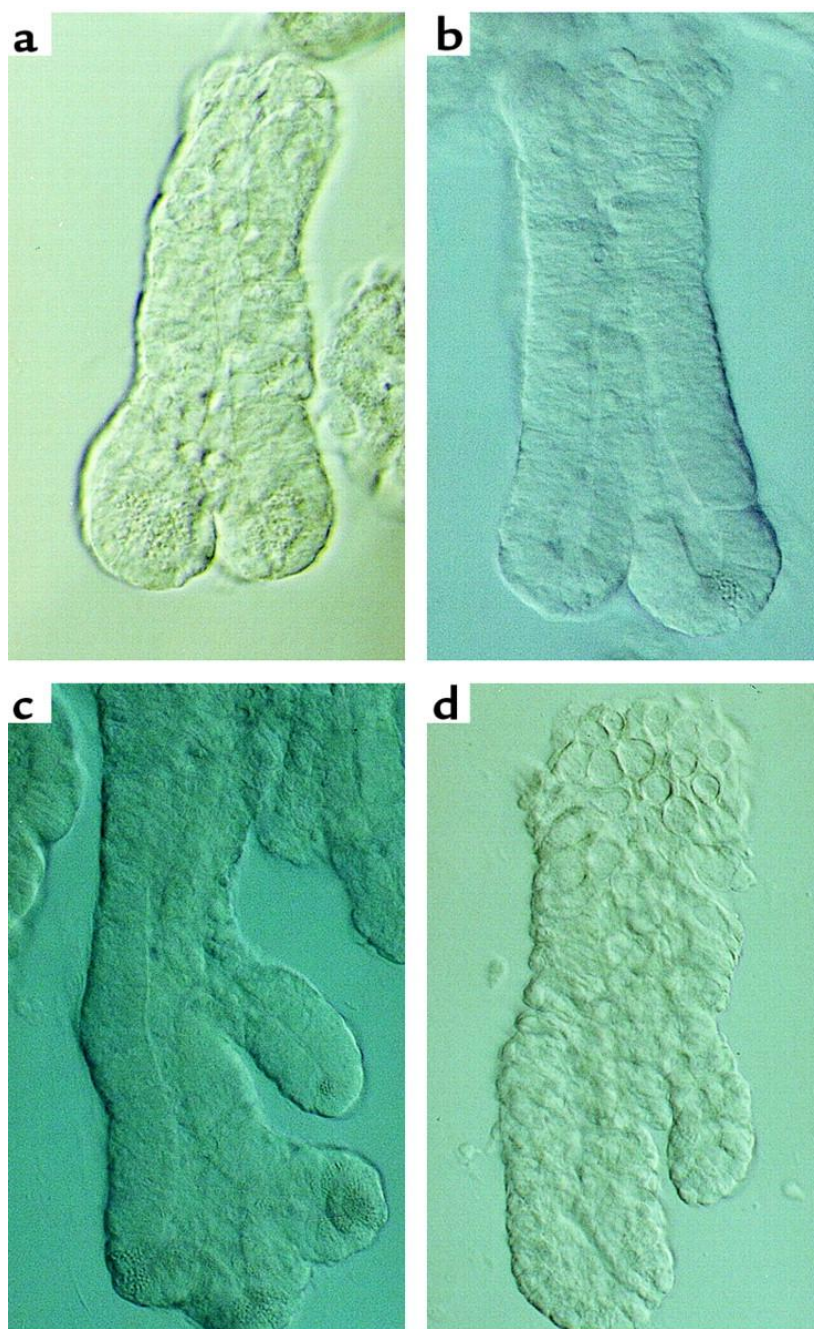


**Рис 2-7. Появление новых суспензионных клонов НСК отпочковыванием при высоких плотностях культивирования**

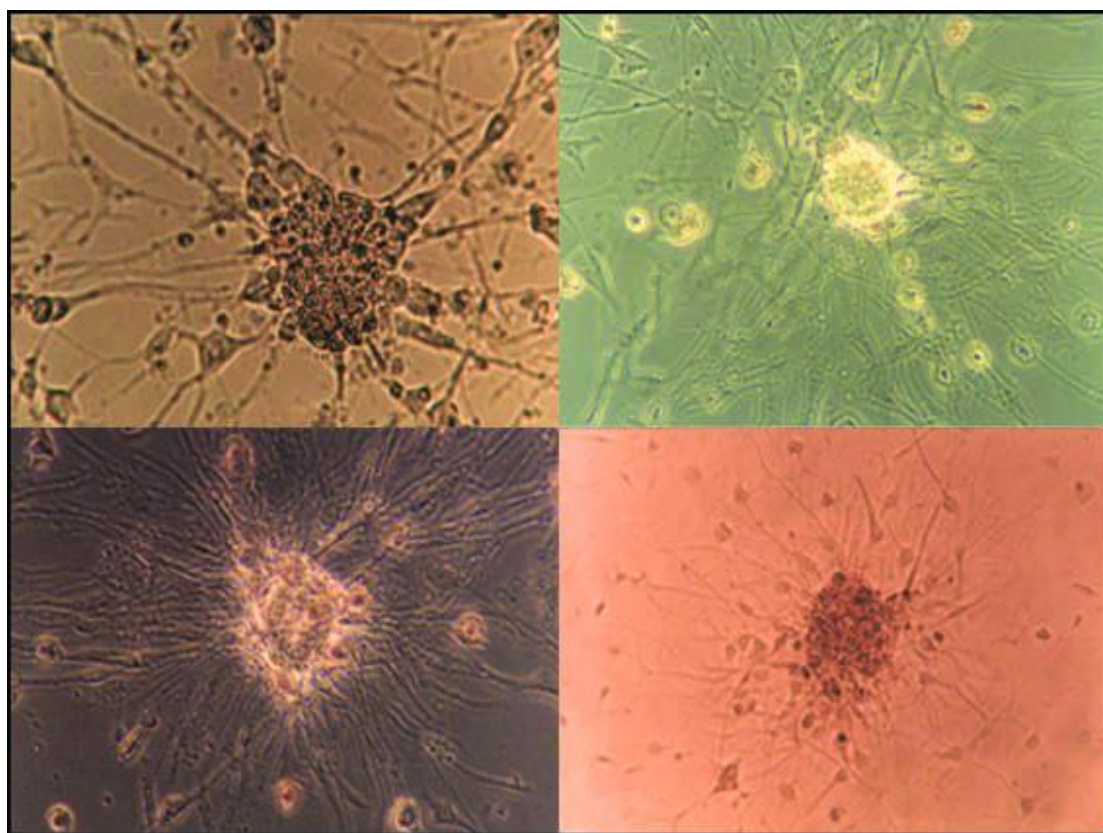
В плотной культуре наблюдали отпочковывание новых колоний из выросших крупных нейросфер. Этот феномен пока мало изучен, поскольку затруднено его моделирование *in vitro*.

Похожие феномены отпочковывания клон-иницирующих клеток наблюдали в культуре изолированных крипт фетального тонкого кишечника при попытке получения клоногенной культуры эпителия тонкой кишки фетуса (Рис 2-8)

Часть клонов в культуре прикреплялась к подложке с помощью крупных распластанных клеток, имеющих фенотип стромальных. Этот феномен был описан ранее в лаборатории Gottlieb при получении нейронов из клеток тератокарциномы (Bain G., Kitchens D., Yao M. et al., 1995). Стимулируя нейрогенез в эмбрионидных телах с помощью ретиноевой кислоты и других добавок, авторы наблюдали опережающей миграцию крупных распластанных по подложке клеток. Далее на их поверхности появлялись клетки типичной формы с отростками, которые имели набор маркеров нейробластов. Авторы не определили природу этих клеток. Однако эффективность нейрогенеза была выше в тех зонах миграции, где появлялись бислойные участки культуры.



**Рис 2-8** Процесс отпочковывания новых клон-иницирующих центров в изолированной крипте тонкого кишечника, выделенной в культуру. Такие фрагменты крипт с двумя и несколькими центрами пролиферации продолжали процесс выделения новых стволовых ниш в культуре.



**Рис 2-9. Спонтанная дифференцировка прогениторных клеток в клонах, прикреплённых к подложке**

Комбинация T3, PDGF LIF индуцировала дифференцировку прогениторных клеток в олигодендроциты. Особенность роста клонов в культуре связана с тем, что все клоны с разной скоростью росли до стадии равновесия (renewal), когда число пролиферирующих клеток уравнивалось числом гибнущих и мигрирующих клеток, покидающих клон. Одним из важных маркеров прогениторных клеток, отличающих их от НСК, является формирование электровозбудимой мембраны, в частности появление кальцевых и натриевых токов, регистрируемых техникой patch-clamp (Piper D.R., Mujtaba T., Rao M.S. et al., 2000). В условиях культуры отношение bFGF+EGF/BMP-4 регулировало как общую численность, так и долю прогениторных клеток в нейросферах. Без BMP-4 оба митогена давали максимальный прирост клеток в нейросферах, тогда как повышение концентрации BMP-4 в среде останавливало



пролиферацию, стимулировало апоптоз и постмитотическую дифференцировку клеток, особенно с периферии клонов (Lillien L., Raphael H., 2000). Изолированные в культуру нейросферы экспрессировали три изоформы рецептора (Erb2, Erb3, Erb4), причем мРНК Erb2 и Erb4 максимальна в прогениторных слоях. In situ максимальную концентрацию мРНК Erb2, Erb4 выявляли в перивентрикулярной зоне и герментативном слое развивающегося мозга крыс (Kornblum H.I., Yanni D.S., Easterday M.C. et al., 2000).

В культуре гетерогенных нейросфер, спонтанно прикрепляющихся к подложке, мы наблюдали опережающую миграцию cadherin-11+ вытянутых биполярных клеток. Позднее вдоль тяжей этих клеток мигрировали типичные ошаренные прогениторные клетки (либо миграция шла целым кластером клеток). Образование клеток радиальной глии из прикрепленных нейросфер, выделенных из коры постнатального мозга человека, наблюдали независимо в лаборатории Clive Svendsen (Caldwell M.A., He X., Wilkie N. et al., 2001). Для этого выросшие нейросферы помещали на подложку полилизин/ламинин и давали сферам прикрепиться. После этого стимулировали миграцию клеток комбинацией NT, CNTF, PDGF. Клетки возникающей радиальной глии с типичными маркерами опережающе мигрировали из сфер.

Нет однозначных представлений по поводу фенотипа и микроокружения НСК, выделяемых из разных отделов головного и спинного мозга. Согласно некоторым данным, превалирующая часть НСК в растущем и зрелом головном мозге локализована в эпендиме латеральных желудочков (Momba S., Johanssen C., Frisen J., 2000). Среди изолированных DIL-меченых эпендимальных клеток только 6% формировали нейросферы. Примерно 3 - 5 % клеток из этой суспензии окрашивались антителами к нестину или Notch 1.

## **10. Методические трудности получения клонов НСК из ЭСК**

В зародыше весь пул НСК нервной трубки образован механизмом нейрональной индукции из эктодермы. Первые нестин+ НСК в нервной трубке возникали у зародышей мыши 7,5 дня развития. Подобно эпибласту, нервная трубка - это

уникальная плюрипотентная ткань, где числом формирующихся клонов НСК реализуется трехмерный проект мозга. На уровне первичных клонов пролиферация определяется превалированием сигналов *poggin*, SHH над BMP-4 и BMP-7 механизмом “дефолта”. Дефолт в развитии – это автоматическая программа активации клеток после устранения ингибиторов (TGF-beta) (Tropepe V., Hitoshi S., Sirard C. et al., 2001). Эти авторы наблюдали частичную трансформацию ЭСК в НСК в редкой культуре без фидера и сыворотки. Существенно, что ЭСК при этом переходе не подвергались предварительной модификации в клетки первичной эктодермы. Присутствие фидерного мезенхимального слоя сдвигало баланс сигналов в пользу других производных эктодермы (эпидермис кожи). Факторы сыворотки также чаще всего блокировали нейрогенез из ЭСК. Из отдельных клеток формировались клоны НСК с промежуточным фенотипом между ЭСК и нейросферами, выделяемыми из концевой мозга новорожденных животных. Единичные самообновляющиеся клоны НСК возникали при плотности 20 ЭСК/мкл и 1000 ед LIF. Другие добавки (B27 supplement, EGF, bFGF) без LIF не индуцировали образование клонов НСК. Этот путь получения нейросфер нерентабелен из-за малой доли (0,2 - 0,4%) образующихся колоний НСК. Показательно, что спектры мРНК исходных ЭСК и колоний НСК не претерпевали существенных изменений, кроме исчезновения мРНК Oct4. В клонках сохранены мРНК всех генов трех зародышевых листков и ранних master-genes рестрикционного созревания клеточных линий. Плюрипотентность клонов НСК позволяла активно химеризовать ткани зародыша-реципиента после имплантации в морулу. С этой целью были получены нейросферы, стабильно меченые цветными белками. Пересаженные НСК активно мигрировали, пролиферировали как в головном мозге, так и других органах зародыша (Tropepe V., Hitoshi S., Sirard C. et al., 2001). В противоположность НСК зародыша, НСК из мозга взрослых животных, теряли способность к химеризации зародышей (Clarke D.L., Johansson C.B., Wilbertz J. Et al., 2000).

Судьба изолированных ЭСК зависела в основном от эпигеномных сигналов (*poggin*, notch, *cerebrus*, LIF, BMP-4, BMP-7). В культуре удалось понять причину блокировки нейрогенеза при высоких плотностях ЭСК - мешают межклеточные взаимодействия между слоями прогениторных клеток. Процент нестин+ клеток

снижался на 75-85% в плотных культурах эмбрионидных телец. Многие авторы подтвердили, что в культуре ЭСК проще наладить получение нейронов, глии (более сложно получить олигодендроциты), чем превратить эмбрионидные тельца в нейросферы ( Okabe S., Forssberg-Nilsson K., Spiro A.C. et al., 1996; Brustle O., Jones K.N, Learish R.D. et al.,1999; Finley M.F.A.,Devata S.,Huettner J.E.,1999). Как известно, пересадки пролиферирующих тотипотентных ЭСК в мозг не практикуются из-за риска малигнизации части клеток. Однако фракцию эмбрионидных телец с дифференцирующимися нейронами удавалось пересаживать в мозг животных без осложнений. После пересадки в мозг часть клеток трансформировалась в нестин+ популяции клеток ( Benniger Y., Marino S., Hardegger R. et al., 2000).

## **11. Получение нейронов из ЭСК**

Уже в начале 90-х годов в печати появились первые протоколы наработки дифференцированных нейронов из ЭСК тератокарциномы (Yao M.,Vain G., GottliebD.L.,1995). Сперва незрелые клетки тератокарциномы размножали с помощью ростовых факторов в простой питательной среде с добавками. Затем клетки переводили в среду без ростовых факторов, в которую добавляли ретиноевую кислоту и B27 Neurobasal supplement. В новой среде селективно выживали только постмитотические нейробласты, а незрелые стволовые/прогениторные популяции погибали. В первых работах эффективность образования нейронов *in vitro* оставалась ниже 10 %. Однако эффективность лабораторного нейрогенеза можно значительно улучшить, если на первом этапе улучшить образование НСК из ЭСК. Сперва необходимо увеличить выход нестин+ клеток в культуре . Затем изолированную популяцию НСК размножали в селективной среде. Выход нейронов из высокоочищенной фракции НСК довели до 60-80%. В конце 90-х годов фирма BioLayton (Калифорния) оказалась первым частным собственником технологической линии с целью крупномасштабного выращивания нейронов человека по всем стандартам GMP. Из стандартного сырья стали готовить биотрансплантаты для

лечения пациентов. Первоначально фирма купила университетский патент Пенсильванского университета (авторы - Virginia Lee, John Troyanovsky, No5792900), заявленный на способ изготовления нейротрансплантата в виде однородной популяции нейронов, полученных из плюрипотентных незрелых клеток эмбриональной тератокарциномы NT2N. Образование нейронов индуцировали добавлением сыворотки и ретиноевой кислоты под контролем следующих маркеров: нестин, NF-1, MAP-2C, alpha-internexin. Через 5-7 дней островки прикрепившихся незрелых клеток начинали синтезировать N-кадхерин и NCAM. Еще через три дня после добавления индукционной среды, состав которой запатентован, клетки образовали нейрофиламенты, увеличивали фосфорилирование компонентов цитоскелета и сигнальных белков. Еще через 10-13 дней культивирования 90-98% клеток приобретали фенотип нейробластов с характерными отростками. Примерно 4-5 нед уходило на созревание нейронов из ЭСК. Нейроны возникали не только из одиночных прикрепленных клеток, но и агрегатов ЭСК. Синхронно с появлением маркеров дифференцировки из клеток исчезал нестин. Более зрелые нейроны экспрессировали белок tau и MAP-2b. Согласно GLP-протоколу, до 95% клеток в культуре превращались в типичные нейроны с характерными отростками, электровозбудимой мембраной и секрецией медиаторов. Остальные незрелые примесные клетки высортировывали на поточном сортировщике клеток. Лабораторно полученные нейроны не ревертировали спонтанно к фенотипу тератокарциномы или незрелых клеток, не давали опухолей при введении в ткани животным. Лабораторно полученные нейроны фирмы BioLayton хорошо выживали после трансплантации в мозге животных-реципиентов. Часть клеток пролиферировала и встраивалась в локальные нейрональные сети (детали см. [www.biolayton.com](http://www.biolayton.com)). На языке профиля мРНК рестрикционное созревание тератокарциномы NT-2 делилось на три этапа. (Przyborski S.A., Morton I.E., Wood A. et al., 2000). В первую фазу увеличивалось число нестин+ клеток, что совпадало с увеличением Notch-1 мРНК. Во вторую фазу роста мРНК NeuroD и снижения мРНК нестина происходило накопление пула прогениторных клеток. Фазу постмитотических зрелых нейронов верифицировали по накоплению мРНК синаптофизина и энлазы и одновременному исчезновению мРНК NeuroD.

Пути дифференцировки нейробластов из ЭСК тератокарциномы прослеживали с помощью профиля экспрессии других генов. В случае дорзальных (чувствительных) нейронов первой появлялась мРНК гена *Rax-7* после добавления ретиноевой кислоты. В случае вентральных нейронов первой детектировалась мРНК гена *Rax-6*. Появление клеток нервного гребня в культуре маркировали появлением мРНК генов *Rax-7* и *Erb3*. Дальнейшее созревание сомато-мотонейронов маркировали экспрессией *Islet-1*, *Islet-2*, *Lim-3*, *HB-9*. Краниальные мотонейроны экспрессировали мРНК *Islet-1*, *Islet-2*, *Phox-2b*. Интернейроны экспрессировали мРНК *Lim-1*, *Lim-2*, *Eng-1* (Renoncourt Y., Carroll P., Filippi P. et al., 1998).

Ключевым моментом созревания ДОПА-нейронов из ЭСК линии NT2 была экспрессия гена тирозингидроксилазы (ТГ). В культуре максимальное количество ТГ+ клеток удавалось получить с помощью трех индукторов : FGF-1, стимулятора внутриклеточного уровня цАМФ (форсколина) и активатора протеинкиназы С (форболового эфира –форбол-12-миристоил-13-ацетата). Эта «триада» вызывала появление 10-20% ТГ+ нейробластов. Однако путем двухнедельной инкубации в специальной среде для дифференцировки долю ТГ+ клеток удалось поднять до 75% (Iacovitti L., Stull N.D., Jin H.,2001). In situ, т.е. в ходе эмбриогенеза ТГ+ нейробласты появлялись под влиянием других сигналов ( SHH и FGF8) ( Stull N.D., Iacovitti L., 2001). Эти данные показали, что лабораторные нейроны с выбранным профилем медиаторов реально получать «неприродным» альтернативным путем, в обход путей и сигналов эмбриогенеза мозга.

Другая стратегия наработки нейронов из линии ЭСК человека намечена сотрудниками фирмы Герон ( Carpenter M.K., Inokuma M.S., Denham J. et al.,2001). В суспензионной культуре ЭСК над фидером нарабатывают значительные массы эмбриоидных телец. Далее начальную дифференцировку запускают прикреплением агрегатов к подложке в среде с набором митогенов. Прикрепленные массы начинают расти незрелой тканью, в которой экспрессируются ранние гены нервной трубки. В ткани формируются клон-иницирующие клетки. Новообразованные клоны маркировались нестином, виментином, GFAP, PC-NCAM. Долю клонов НСК можно значительно увеличить путем подбора митогенов в селективной среде. При пересадке выращенной незрелой ткани, напоминающей нервную трубку, в мозг новорожденным мышам наблюдали

интенсивную миграцию прогениторных клеток в разные отделы мозга с последующей дифференцировкой в нейроны, глию и олигодендроциты ( Carpenter M., Inokuma M.S., Denman J., 2001)

Ретиноевая кислота оказалась первым незаменимым индуктором нейрогенинов или Neuro D на пути дифференцировки ЭСК в нейроны. Однако нет четких однозначных прописей получения холинэргических, ГАМК- или серотонинэргических нейронов на втором этапе дозревания бластных форм. Комбинации ростовых факторов, нейротрофинов и других индукторов в лучшем случае заканчивались смешанной дифференцировкой нейронов *in vitro* ( Takahashi J., Palmer T.D., Gage F.H., 1999). Существенно также, что нейрогенез *in vitro*, запускаемый ретиноевой кислотой, формировал нейроны из агрегатов, прикрепленных к поверхности крупных распластанных клеток ( по фенотипу –это клетки первичной эктодермы , либо нейромезенхимы )( Bain G., Kitchens D, Uao M. et al., 1995).

## 12. Получение линий НСК

Бессмертная линия стволовых клеток остается наилучшим лабораторным GMP-сырьем для биотрансплантатов в отсутствие фетальной ткани. Стандартно получаемые клетки из нестандартного биосырья незаменимы на стадии предклинических испытаний. Международные GMP-стандарты отдают предпочтение генетически однородным клеткам (Snyder E.,1994 ). (Таб 1) . Уже много десятилетий линии пассируемых плюрипотентных раковых клеток использовались для трансплантаций на животных. Наибольшее распространение получила линия PC12 , выделенная из феохромоцитомы человека. Эти пассируемые мультипотентные предшественники являются клетками-дериватами нервного гребня. Линия CG9 была получена из глиомы человека . Геном клеток этой линии наделен плюрипотентностью, как и геном тератокарциномы P19 . Но клетки этих линий не встраиваются в бластоцисту и не интегрируются в нормальное развитие зародышей в отличие от других линий ЭСК.

Таблица 1 Преимущества GLP- линий НСК для предклинических испытаний

Преимущества над	Преимущество над	Преимущества перед
------------------	------------------	--------------------

фетальной тканью	первичной культурой нейронов	другими соматическими клетками
<ul style="list-style-type: none"> <li>*Гомогенные клетки</li> <li>*Нелимитированные количества</li> <li>* Наличие банка ( т.е. доступность во времени и пространстве, легкость транспортировки)</li> <li>*Контролируемое качество материала на уровне фенотипа и активности клеток</li> <li>*Контролируемая пролиферация и дифференцировка клеток</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Стандартная однородность клеток</li> <li>* Любые количества</li> <li>*Легкость плановой заготовки трансплантата</li> <li>* Воспроизводимый фенотип клеток</li> <li>* Возможность выполнения всей экспериментальной работы на одной выборке клеток</li> <li>* Доступность митотических клеток позволяет использовать методы генной модификации и инженерии</li> <li>* Исходная однородность клеток позволяет более строго оценивать мультипотентность НСК и терапевтические эффекты на животных</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Позволяет оценить специфику вклада НСК по сравнению с самой процедурой трансплантации</li> <li>*Иногда позволяет учесть вклад нейроспецифических генов, ростовых факторов или факторов регенерации</li> <li>*Оценка специфики взаимодействий НСК с органами, особенно ЦНС</li> </ul>

Линии НСК особенно важны в предклинических исследованиях на животных, имея превосходство перед гетерогенной первичной культурой . Без линий было бы невозможно выявить все возможные пути воздействия клеточного трансплантата на поврежденный мозг. Большой интерес вызвала условно бессмертная линия НСК, изолированная из нейроэпителлия трансгенных зародышей мыши. Для иммортализации использовали температуро-чувствительный онкоген. В культуре при 20-25С клетки

неограниченно пролиферировали, но переставили делиться и дифференцировались при 37С (Hodges H., Veizovic, Bray R. et al., 2000). Главное преимущество линейных клеток для трансплантации обусловлено их тремя свойствами: 1) высокая миграционная активность 2) дифференцировка в нейроны с разным профилем медиатора, причем окончательная дифференцировка донорских клеток диктовалась микроокружением. Следовательно, общий пул клеток, трансплантированных в латеральный желудочек, превращался в разные нейроны в разных отделах мозга реципиента 3) в зоне окончательной локализации пересаженные клетки не нарушали нормальной организации ткани, не вызывали локальной дисплазии или гибели клеток. Мышиная линия иммортализованных прогениторных клеток МНР-36, полученная на фирме ReNeuron, испытывалась на крысах с постишемическим поражением мозга, вызванными краткосрочным пережатием средней церебральной артерии (Veizovic T., Beech J.S., Stroerner R.P. et al., 2001). Нарушение двигательных навыков оценивали рядом объективных количественных тестов, в том числе по скорости/эффективности снятия с лап кусочков липкого пластыря. Если МНР-36 клетки трансплантировали между 1-2-й нед после ишемии, удавалось компенсировать ранние нарушения двигательных расстройств, которые никак не могли объясняться встраиванием клеточного трансплантата в мозговую ткань крысы (слишком короткие сроки для клеточного замещения утраченных нейронов). Одностороннее введение однородных прогениторных клеток давало коррекцию повреждения в обоих полушариях, что говорило о стимуляции регенерации или формировании новых зон синаптогенеза, с помощью которых компенсировались утраченные двигательные навыки. Стереотаксические пересадки линии МНР-36 в гиппокамп старых крыс или взрослых крыс с повреждением СА1 зоны гиппокампа (модель утери пространственных навыков и переобучения) были использованы для доказательства возможной компенсации утраченных функций гиппокампа за счет образования нового химерного органа, собранного из нейронов донора/реципиента (Hodges R., Veizovic T., Bray N. et al., 2000). Модель использована также для региональных трансплантаций НСК с целью компенсации феноменов “старения” мозга.



В другой работе ( Philips M.F., Mattiasson G., Weloch T. et al, 2001) прогениторные клетки линии HiB5, изолированные из гиппокампа и трансфицированные геном ростового фактора NGF, вводили через 48 часов после механической травмы головного мозга. Уже через 3-5 суток ( т.е. в очень ранний посттравматический период) отмечали значительную компенсацию нарушенных моторных функций животного. Быстро развивающийся положительный эффект невозможно объяснить на основании известных клеточных механизмов компенсации, поскольку все они требовали значительного времени.

В совместном шведско-американском проекте, выполненном в лаборатории Рона МакКея и Эндерса Бьорклунда, были получены температуро-зависимые линии НСК/прогениторных клеток, изолированные из гиппокампа и стриатума мозга человека ( Lundberg C., Martinez-Serrano A., Cattaneo E. et al., 1997). Если клетки гиппокампа активно обновлялись в мозге взрослых животных и человека, то стриатум практически не имел детектируемого обновления клеток. Поэтому было важно сопоставить эффекты пересадок прогениторных клеток в гиппокамп и стриатум. В стриатуме взрослых животных не бывает обновления собственных клеток. Поэтому БУДР селективно визуализировал донорские клетки *in situ*. После пересадки клетки выживали в течение 6 мес. Количество живых клеток в трансплантате было достоверно больше (в 2-3 раза) при пересадке в мозг животного с экспериментальным повреждением стриатум. Однако обнаружить встраивания донорских клеток в сети нейронов ткани реципиента не удалось. Поэтому пересадки лабораторных линий прогениторных клеток предлагалось использовать для направленной доставки генов, контролирующей выработку нейротрофических факторов или митогенов, стимулирующих регенерацию собственной паренхимы.

Множественно пассируемую линию НСК получил в Италии Анджело Вескови, не прибегая к онкогенам. (Kallos M.S., Behie L.A., Vescovi A.L.,1999). Коммерческие линии НСК человека в суспензионных биореакторах были получены в совместном итало-канадском проекте ( Kallos M.S., Behie L.A.,1999). Собственные линии НСК человека для экспериментов на животных, а также для подготовки первых клинических испытаний получили испанские исследователи ( Rubio F.J., Bueno

C., Villa A. et al, 2000; Villa A., Snyder E.Y., Veskovi A.L. et al., 2000 ). В этих работах использовали селекционное пассирование клонов НСК в среде, содержащей сразу два ростовых фактора (EGF и bFGF). Среди первичных нейросфер удалось наткнуться на клоны с необычно мощной и долгосрочной потенцией к самообновлению и высоким индексом пролиферации. Полученную линию НСК пассировали более 50 раз в течение 1,5 лет. От нее получено уже сотни млн прогениторных клеток для биотрансплантатов.

Линию плюрипотентных НСК мозжечка зародышей мыши (C17-2) получил Evan Snyder для лечения модельных заболеваний мышей, в том числе экспериментальной демиелинизации ( Taylor R.M., Snyder E.Y., 1997). У 60 % мышей линии shiverer трансплантация НСК вела к устранению тремора – главного признака демиелинизации. При введении в мозг плюрипотентные клетки этой линии мигрировали и расселялись практически по всем регионам мозга. (Yandava V., Billingham L., Snyder E.Y., 1999). Существенно, что стволовые клетки наделены автоматикой целенаправленной миграции в зоны повреждения мозговой ткани. Детали этих исследований можно найти в патенте Снайдера ( No 5958767). Пересадки линии НСК человека, как и мышинной линии C17-2 использовали для доказательства терапевтической эффективности клеток с целью лечения наследственных заболеваний ЦНС. Например, пересадки НСК в мозг мышей с накаутом гексаминидазы ( модель болезни Тей-Сакса у детей) приводили к существенному снижению уровня токсичных Gm2 -ганглиозидов в реципиентной ткани мозга за счет доставки лимитирующего фермента (гексаминидазы) лизосом, удаляющего избыток накопленных фосфолипидов ( Lacorazza H.D., Flax J.D., Snyder E.Y. et al., 1996). Ранее было известно, что пересадки донорского костного мозга были эффективны в ликвидации последствий болезни в висцеральных органах, но не в ЦНС. Пересадки линий НСК были предложены в качестве прямой доставки нормальной аллели гена гексаминидазы для коррекции метаболизма фосфолипидов в головном мозге. Платформу будущей терапии формирует доказанная клеточная стабильная химеризация мозга реципиента донорскими НСК.

Линии НСК были изолированы не только из зародышей, но новорожденных и взрослых мышей ( Flax J.D.,Auroga S.,Yang C. et al, 1998). По той же стратегии была выделена НСК из перивентрикулярной ткани фетального мозга. Сперва получали первичную клоногенную культуру НСК, затем отбирали наиболее быстро пролиферирующие клоны, которые трансфицировали конструкцией из рестровирусного вектора и двух генов : v-мус ( для иммортализации) и lac-z ( микробный ген бета-галактозидазы для визуализации ). Первый ген был поставлен под промотер нестина, второй – под промотер неомицина. 3 линии были получены из трех разных быстро растущих клонов. Клональность линии подтверждалась единственным местом вставки v-мус в геном. Линии длительно пассировали без изменения генотипа (анеуплоидия) и фенотипа (маркеры НСК). Сохранялась плюрипотентность клеток *in vitro*. У линий не была выявлена туморигенность. Важнейшей характеристикой наиболее изученных линий НСК оставалась пластичность: большинство трансплантируемых клеток дифференцировались в нейроны и глию, преобладающие в месте нахождения трансплантата. Вновь подтвердилась первостепенная значимость сигналов микроокружения в судьбе клеточного трансплантата (Vescovi A.L., Snyder E.Y., 1999). Первые заметные результаты эта лаборатория получила, используя пересадку линии 17.2 в мозжечок мутантным мышам *meander tail*. Эти животные имели наследственные дефекты костной системы и аномалии архитектоники в мозжечке. Основу мозжечковых расстройств составляли дефекты миграции незрелых гранулярных клеток. Это вело к двигательным расстройствам. Пересадки клеток линии 17.2 восстанавливали клеточную организацию внутреннего и внешнего гранулярного слоя. Пересадки позволили выяснить как функционирует мутантный *mea* ген в мозжечке, путем сопоставления коррекции мозжечковых расстройств с гистологической картиной поэтапного восстановления цитослоев в мозжечке ( Rosario C.M., Yandava B.D., Kosaras B. et al., 1997). При трансплантации в боковые желудочки или субвентрикулярное пространство мозга новорожденных клетки активно мигрировали в разные отделы мозга по преформированным путям. Трансплантация этих клеток в герментативный слой мозжечка приводила к миграции, дифференцировке и встраиванию прогениторных клеток в наружный гранулярный слой. Реже из донорских клеток формировались клетки Пуркинье и олигодендроциты.

Только некоторые линии НСК отличались высокой скоростью миграции и высоким индексом встраивания в преформированный гранулярный слой. Пересадки первичной суспензии клеток фетального мозжечка в мозжечок иммунодефицитных животных были более эффективными в терминах количества и эффективности восстановления цитоархитектоники слоев донорскими клетками (Pundt L.L., Jom E.A., Low W.C., 1997). Возможно, что причиной высокой приживляемости клеток является исходный синергизм взаимодействия гетерогенных прогениторных/бластных клеток, созревающих в разном направлении. Функциональное встраивание донорских клеток доказывалось необратимой утерей экспрессии (*v-myc*) и клеточных делений. Репаративные способности этой линии были сперва апробированы на линии мутантных мышей *meander*, имевших недоразвитие гранулярного слоя нейронов в передней доле мозжечка. Введение донорских НСК в паренхиму вело к направленной миграции и аккумуляции прогениторных клеток вдоль границы внутреннего гранулярного слоя, где завершалась их дифференцировка. Донорские клетки после встраивания визуализировали с помощью маркерной бета-галактозидазы. Недостатком линий в плане клинического применения является малый процент новообразованных нейронов по отношению к глии. Это происходило в том числе из-за высокой концентрации BMP-2/4 в паренхиме взрослого мозга (Gokhan S., Song Q., Mehler M.F., 1998).

Весьма перспективными представляются пересадки НСК для лечения атаксии-телангиоэктазии – фатального наследственного заболевания детей. Болезнь вызывается мутацией ATM (*AT-Mutated*) гена, контролирующего синтез сигнальной фосфоинозитолкиназы (PI3-kinase), участвующей в функционировании мультиферментного сигнального комплекса в хроматине. Этот сигнальный комплекс имеет множественные функции в клетке. Плейотропные эффекты мутации ATM проявляются в гибели клеток Пуркинье мозжечка, дегенерации мотонейронов, иммунодефиците из-за дефектов стромы тимуса (максимальное содержание ATM комплекса обнаружено в мезенхимальных клетках). На клеточном уровне дефект проявляется в ускоренной гибели клеток вследствие утери чувствительности к кислородным радикалам. Утрата иммунитета ведет к раннему возникновению

опухолей. Пересадки НСК в мозжечок PCD(Purkinje cell deficient) мышей, приводили к восстановлению слоя клеток Пуркинье, формированию функционального слоя донорских клеток, контактирующих с клетками внутреннего гранулярного слоя реципиента. Морфологические признаки восстановления клеточных слоев сопровождалось уменьшением тремора и патологии движений.

Похожие на атаксию мозжечковые расстройства вызываются генетическим дефицитом активатора плазминогена. В мозговой ткани зародыша активатор плазминогена контролирует направленную миграцию нейронов и рост нейритов. Его дефицит особенно проявляется дезорганизацией роста клеточных слоев в мозжечке с симптомами атаксии (Seeds N.W., Basham M.E., Haffke S.P., 1999). До 40% пациентов с острым инфарктом миокарда и нарушением системного кровообращения имели нарушения памяти и распознавания новизны в результате ишемического повреждения гиппокампа (Virley D., Ridley R.M., Sinden J.D. et al., 1999). Близкие нарушения памяти и обучения имели пациенты с болезнью Альцгеймера на базе нейродегенеративных нарушений гиппокампа. Глобальная ишемия в послеоперационном периоде вследствие гипоперфузии мозга также является частой причиной ишемических повреждений гиппокампа и других мозговых структур. Могут ли такие поздние локальные повреждения нейронов взрослого мозга «опознаваться» донорскими НСК? Для этого разработали модель избирательного повреждения пирамидальных нейронов двигательной коры взрослых мышей с помощью направленного фотолиза. Сперва к клеткам ограниченной зоны доставляли фотосенсибилизатор на гранулах микроносителя. На втором этапе зону мозга освещали лазерным лучом, что через 8-10 дней вызывало массовую локальную гибель клеток апоптозом (Snyder E.Y., Yoon C., Flax J.D. et al., 1997). Затем НСК линии 17.2, меченые геном *lacZ*, вводили в латеральный желудочек. Было показано, что основная часть пересаженных клеток мигрировала и накапливалась в зоне повреждения. Характерно, что интенсивная направленная миграция незрелых клеток происходила без формирования радиальной глии, т.е. эта миграция клеток не повторяла события эмбриогенеза во взрослом мозге животного. При пересадке нейросфер миграция

осуществлялась с помощью клеток радиальной глии, которые опережающе возникали из клонов НСК.

Интерес в последние годы вызывают некоторые Нох-гены в связи с проблемами иммортализации стволовых/прогениторных клеток ЦНС. Была обнаружена асимметрично высокая экспрессия гена Рах-3 в медуллосаркоме человека. В изолированной линии медуллосаркомы с высокой экспрессии Рах-3 были отмечены следующие общие изменения фенотипа клеток: а) 2-4-кратное повышение активности 8-полисиалилтрансферазы, генерирующей poly-S-NCAM на поверхности клеток б) клетки увеличивают миграцию за счет утери межклеточных контактов (Mayanil C.S., George D., Mania-Farnell D., 2000). Далее у многих миогенных и нейрогенных опухолей была выявлена повышенная экспрессия генов Рах-3/Рах-7. Эта фенотипическая особенность сохранялась в клеточных линиях, изолированных из первичной опухоли (Barr F.G., Fitzgerald J.C., Ginsberg J.P., 1999).

НСК можно идентифицировать по поведению в реципиентной ткани мозга зародышей и постнатального мозга. Согласно многочисленным данным, НСК и прогениторные популяции при введении в полость желудочков активно мигрировали в паренхиму, накапливались в субвентрикулярной области. Далее клетки расселялись буквально по всем отделам развивающегося мозга - от коры больших полушарий и мозжечка до ствола мозга (Brustle O., Choudry K., Karram K. et al., 1998). Идентификацию НСК человека, расселяющихся в мозг развивающихся зародышей крыс, проводили до и после рождения животных с помощью генетических маркеров ДНК человека (сиквенсы alu) и иммуноморфологических маркеров. Пересадки мышинных НСК в развивающийся мозг зародышей крыс позволили без иммуносупрессии получать новорожденных животных, мозг которых собран из клеток двух видов грызунов (Olsson M., Bjerregaard K., Winkler C. et al., 1998). Донорские ростки стволовых клеток не только делились и мигрировали с высокой скоростью, но и обладали способностью находить места повреждения паренхимы мозга. Например, пересадки нормальных НСК в мозг животных с наследственными аномалиями приводили к частичной компенсации функционального дефекта. Терапевтический эффект обусловлен стабильным выживанием и функционированием донорских

нейронов, возникших из стволовых клеток в нервной ткани реципиента (Yandave B.D., Billingham L.L., Snyder E., 1999; Zigova T., Sanberg P.R., 1998). Трансплантация предшественников олигодендроцитов в латеральный желудочек приводила к массивной миграции донорских клеток по всей паренхиме мозга животных-реципиентов с появлением множественных очагов ремиелинизации (Learish R.D., Brustle O., Zhang S.C. et al., 1999).

Пересадки НСК на животных подтвердили самое важное : трансплантированные в паренхиму мозга незрелые клетки вели себя предсказуемо, не формировали аномальных клеток, не генерировали опухолей (Zhang S.C., Wernig M., Thomson J.A., 2001) После пересадки НСК/прогениторные популяции продуцировали только нейроны, олигодендроциты, астроглию, но не гематогенные ростки, кардиомиоциты, или клетки серкреторных желез. Факторы и сигналы окружающей среды *in vivo* оказывали предпочтительное влияние на дифференцировку имплантированных незрелых клеток. Это позволяет рассчитывать на безопасность метода в клинике .

Сравнительный анализ выживаемости, пролиферации, стабильной дифференцировки НСК *in situ*, полученных из разных источников, четко доказал преимущество: а) прогениторных клеток поликлонального происхождения ( более полиморфных популяций) б) клонов (нейросфер) по сравнению с культурой монодисперсных клеток, растущих прикрепленным монослоем ( см. детали в статье Rubio F.J., Bueno C/. Villa A. et al., 2000).

### **13. Трансплантация НСК/прогениторных клеток в развивающийся мозг эмбрионов**

Лабораторно полученные высокоочищенные прогениторные клетки использовали для пересадки в развивающийся мозг мышей и других лабораторных млекопитающих. Сперва клетки линии ЭСК наращивали до больших плотностей над фидером в среде ДМЕМ-20% FCS + 1000 U LIF/мл. Для получения эмбрионных агрегатов клетки переносили на чашки, покрытые желатиной, а также убирали LIF из среды. Через 4 дня меняли на селективную среду пролиферации (ДМЕМ/F12 + 5мкг/мл инсулина, 30 нм селениум хлорида, 5 мкг/мл фибронектина. За 72 в селективной среде пролиферации 80% клеток погибало. Среди оставшихся выживших клеток более 80%

были нестин+ веретенovidные прикрепившиеся клетки. Эти клетки прокрашивались антителами к кератину 8 и поверхностному антигену SSEA-1 (Brustle O., Spiro C., Karram K. et al., 1997). После инъекции очищенных прогениторных клеток человека в телэнцефалические пузырьки мозга зародыша крысы 15-20 дня гестации наблюдали массивную миграцию пересаженных клеток по всем растущим областям мозга. Наибольшая доля клеток мигрировала из желудочков в серое вещество коры, corpus collosum, стриатум, гипоталамус, гиппокамп, обонятельную луковицу, где дифференцировались в нейроны и астроглию. Позднее всех появлялись олигодендроциты (если вводить трансплантат на поздних сроках развития плодов). Часть пересаженных клеток оставалась в эпендиме желудочков, где формировались кластеры донорских клеток в монослой эпендимы. Хотя пересаженные прогениторные клетки содержали примесь типичных ЭСК, ни в одном случае не наблюдали образования тератокарцином. Результаты показали, что с помощью повторных пересадок можно достичь высокой доли химеризации мозга крыс.

#### **14. Трансдифференцировка НСК после трансплантации**

В этом разделе упомянем лишь корректно выполненные работы, содержащие безукоризненные доказательства трансформации НСК в соматические клетки вне ЦНС и ПНС. Первая работа Bjernson, выполненная с клетками, мечеными геном микробной бета-галактозидазы, верифицировала появление донорских меченых клонов гематогенных клеток в костном мозге облученных мышей (Bjornson C.R., Rietze R.L., Reynolds B.A. et al., 1999). Позднее у тех же мышей донорские клоны гематогенных клеток были изолированы из селезенки и кровотока методом поточной цитофлуориметрии. В следующей работе была продемонстрирована возможность количественной химеризации скелетных мышц конечностей с помощью пересадок НСК мыши и человека в мышцы животного

(Galli R., Borello U., Gritti A. et al., 2000). Меченые геном бета-галактозидазы НСК, изолированные из эпендимы мозга взрослых животных, после инъекции в бластоцисты мыши давали ростки донорской соматической ткани в скелетной и сердечной мышце, кишечнике, мозге, коже, но не в кровеносной системе костного



мозга ( Clarke D.L., Johanssen C.B., Wilbertz J. et al, 2000). Эти особенности колонизации разных органов могли быть связаны с фракцией НСК из эпендимы. В последующих исследованиях приведены убедительные доказательства гетерогенности НСК, полученных одновременно из эпендимы/субэпендимы ( Rietze R.L., Vacanis H., Bresker G.F. et al., 2001). Изолированные популяции имели гетерогенный фенотип. 80% клеток формировали клоны (нейросферы). Эта работа подтвердила полученные ранее данные о высокой морфологической и иммунофенотипической гетерогенности НСК, выделенных из тех же отделов мозга фетусов. Природа выявляемой гетерогенности пока не имеет достаточно аргументированных объяснений.

### **15. Нейромезенхимальные стволовые клетки нервного гребня**

Во время нейруляции только млекопитающие формируют уникальный провизорный орган - нервный гребень(НГ) по всему длиннику зародыша - от промежуточного мозга до сакральных сомитов и ниже. НГ состоит из двух тяжей плюрипотентных зародышевых клеток между эктодермой и нервной трубкой, которые возникают за счет сигналов, возникающих одновременно в нервной трубке и прилегающей эктодерме. Клетки будущего НГ мигрируют из нервных складок - растущих концов открытой нервной трубки. Совместная инкубация эксплантатов нервной пластинки и эпидермиса достаточна для образования клеток НГ в обоих кусочках ткани (LaVonne C., Bronner-Fraser M., 1999). Момент появления клеток НГ определяют по мРНК двух маркерных генов –Slug, Snail, позднее Pax-3. Точную комбинацию сигналов, запускающих появление клеток НГ как *in situ*, так *in vitro* пока не удалось определить. Блокада рецепторов для FGF частично приостанавливала появление клеток НГ. Появление гликопротеина Noelin1 на поверхности клеток маркирует первые клоны НГ в нервной трубке. Ретровирусная сверхэкспрессия Noelin1 ведет к длительному образованию и миграции клеток НГ в нервной трубке зародышей млекопитающих (Christiansen J.H., Coles E.G., Wilkinson D.G., 2000)

Показательно, что клетки НГ невозможно получить лабораторным путем – из ЭСК, НСК или клеток первичной эктодеомы. Фетальная ткань мозга остается единственным источником клеток НГ. Еще долгие годы фетальная ткань мозга будет служить источником для выделения уникальных провизорных линий из разных органов. Например, аорта фетусов служит уникальным банком ангиобластов, которые невозможно выделить из других тканей.

В головном отделе из клеток НГ образуются ганглии черепно-мозговых нервов, слуховой, вестибулярный и цилиарный ганглии. Часть клеток головной части НГ идет в стволовые клетки сосудистых сплетений (chorioid plexuses). Значительная часть клеток НГ дифференцируется в астроциты, микроглию и олигодендроциты. Подобно строме эти клетки в дальнейшем вырабатывают ростовые факторы (bFGF, EGF, TGF- $\alpha$ , NGF, PDGF, HGF, ILGF-1, NGF, NT3, GGF), адресованные стволовым и прогениторным клеткам (Mentlein R., Kendall M., 1999). Одновременно клетки НГ играют роль "провизорной мезенхимы", поддерживающей развитие среднего и заднего мозга. Локальное удаление головной части клеток НГ вело к массивному апоптозу нейроэпителия и аномалиям прозомеров (Etcheveres H.C., Couly G., Vincent C. et al, 2000). Головная часть клеток НГ служила донором стволовых клеток для образования глакомышечных клеток, перицитов всей артериальной и венозной системы лица и шеи (Etchevers H.C., Vincent C., Le Douarin N.M. et al., 2001).

На уровне 1-7 сомитов из НГ формировались ганглии вегетативной нервной системы внутренних органов. Из туловищного отдела НГ возникали чувствительные ганглии спинного мозга, клетки мозгового вещества надпочечников и меланоциты. Миграция клеток НГ происходила по всем сегментам зародыша. Два главных потока мигрирующих клеток шли по вентральной и дорзо-латеральной стороне зародыша в места будущего расположения ганглиев, надпочечников, периферической нервной системы. Антитела к фибронектину, коллагену и ламинину, как и антитела к молекулам адгезии частично подавляли локомоцию клеток *in situ*. Из пула клеток НГ возникало значительное число меланоцитов как покровных тканей, так и внутренних органах. Клетки НГ возникали в результате эпителио-мезенхимальной трансформации. Эта трансформация сопровождалась экспрессией Нох-генов (Slug, gooseoid, Dlx2, Dlx3, Barx1, dHAND, eHAND). На поверхности стволовых /прогениторных клеток НГ

экспонирован рецептор для эндотелина-1 (Clouthier D.E., Williams S.C., Yanagisawa T.E. et al, 2000). Ген Slug остается наиболее универсальным маркером эпителио-мезенхимальной трансформации клеток, поскольку антисенс-олигонуклеотиды мРНК Slug наиболее эффективно её блокировали (LaBonne C., Bronner-Fraser M., 1999). Вторично было блокировано появление миграторных популяций клеток НГ. Экспрессия гена Pax-3 превращала клетки-предшественники НГ во временную линию на период их расселения по организму. Трансфекция и сверхэкспрессия гена Pax-3 приводила к образованию иммортализованных фибробластов, которые давали опухоли в nude - мышах (Maulbacker, Gruss, 1993). Непосредственной мишенью действия продукта гена Pax-3 является ген Msx-2 - контролер плюрипотентности пролиферирующих незрелых прогениторных клеток НГ (Kwang S.J., Brugger S.M., Lazik A. et al., 2002). Экспрессия Pax-3 в прогениторных клетках одновременно включала другой ген – Foxd3. Способствуя экспрессии транскриптазе HNK-1 и кадгерину-7, продукт гена Foxd3 усиливал миграцию ранних прогениторных клеток из НГ (Dettori M., Gross M.K., Goulding M., 2001). Популяция мигрирующих предшественников периферической глии маркировалась антителами к транзитину (Henion P.D., Blyss G., Luo B., 2000). Популяция прогениторных клеток НГ, мигрирующих в сердце, маркировалась рецептором для PDGF. Ретиноевая кислота в тератогенных дозах вызывала подавление экспрессии «навигационных» рецепторов и запускала аномалии миграции клеток НГ in situ (Li J., Molkentin J.D., Colbert M.C., 2001).

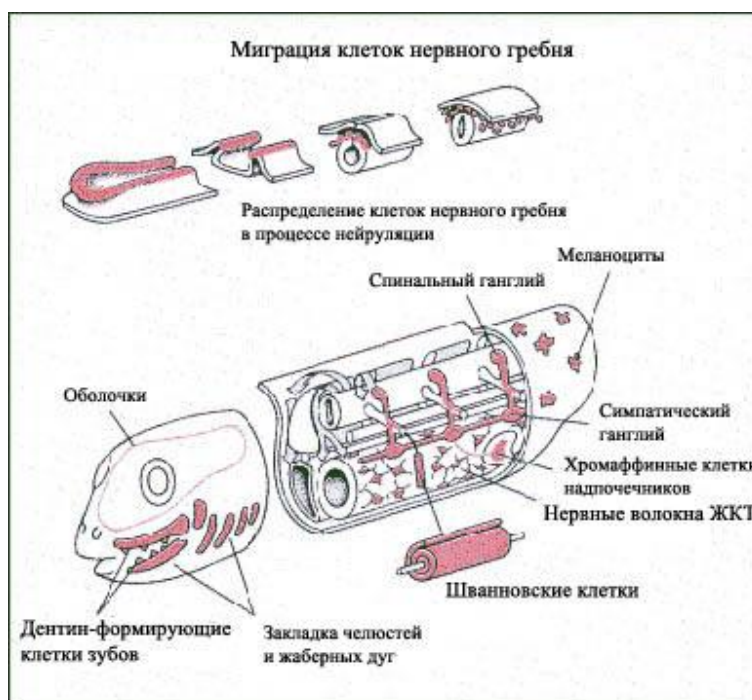
Для эпителиомезенхимальной трансформации характерно изменение спектра поверхностных молекул адгезии. Если в центре клона промиграторные клетки плотно сцеплены молекулами N-кадгерина, то мигрирующая популяция прогениторных клеток НГ экспонировала кадгерин-6 и кадгерин-11 (Simoneau L., Kitagawa M., Suzuki S. et al, 1995). Во время эпителио-мезенхимальной трансформации в клетках головной части НГ активировался Нох-7 ген. Характерно, что у части клеток хориодного сосудистого пучка, которые мигрировали в головной мозг и встраивались в слой эпендимы, происходила активация близкого Нох-7 гена (MacKenzie A., Ferguson M.W., Sharpe P.T., 1991).

Пересадки плюрипотентных клеток проамниона (внеэмбриональной эктодермы) между эктодермой и нервной трубкой зародыша также вели к появлению клеток НГ из клеток трансплантата. Это доказало решающую роль сигналов микроокружения в первичном возникновении клеток НГ. Обнаружен критический период, когда концентрация сигналов, способствующих образованию клеток НГ, достигала максимума (Ruffins S., Bronner-Fraser A.M., 2000). Локальные инъекции SHH блокировали появление эндотелин-позитивных и Slug+ прогениторных клеток. Noggin, Vmp-4, BMP-7 не влияли на появление клеток НГ. Как в случае нервной трубки, появление первых клонов стволовых клеток НГ было сопряжено с активацией одного из Sox- генов (Sox-10). Гены этого семейства отвечают за плюрипотентность стволовых клеток (Cheng Y., Cheung M., Abu-Elmagd M.M. et al., 2000 ). Промиграторные прогениторные клетки клонов НГ также сохраняли плюрипотентность. Подтверждением служил тот факт, что клоны плюрипотентных клеток НГ удалось выделить как из периферических нейронов симпатической парасимпатической НС, так и периферических ганглиев. Мигрируя на десятки см на периферию, часть прогениторных клеток сохраняла мультипотентность. Однако большинство одиночных мигрирующих клеток, покидающих клон, сохраняли более ограниченную коммитацию к дифференцировке.

Клетки головного отдела НГ мигрировали дорзовентрально, формируя костно-мышечный и хрящевой каркас, соединительную ткань лицевого черепа и шеи (включая хрящи гортани, уха, внутреннего уха, строму тимуса, нейроэпителий щитовидной железы, зачатки зубов). Взаимодействия мигрирующих клеток головной части НГ и эпителия тимуса приводили к локальной экспрессии транскрипционных факторов Noxa3, Pax1 и Wnt, необходимых для созревания вилочковой железы. Внутриутробные аномалии развития и дефект миграции клеток НГ ответственны за развитие некоторых врожденных иммунодефицитов (типа синдрома DiGeorge).

Клетки НГ, расположенные между миотомами и спинальным отделом нервной трубки, были донорами клеток ганглиев периферической симпатической и парасимпатической нервной системы, проводящей системы и клапанов сердца, нейросекреторных клеток надпочечников, гладкомышечных клеток артерий, меланоцитов кожи, чувствительных нейронов спинного мозга, шванновских клеток.

Сегментация НГ на отделы шла с помощью еrh-лиганда и еrh- рецепторов. Граница раздела сегментов НГ, как и в нервной трубке, проходила по бислою еrh-R- еrh-L клеток. Пересаженные клетки НГ от раннего зародыша перепела в мозг зародыша крысы мигрировали в кости и мышцы лицевого черепа, пока территории мозга не были поделены бислоями клеток содержащих пару еrh-R-еrh-L. Клетки зародыша перепела более поздних сроков развития мигрировали в сердце, вегетативные ганглии тонкого кишечника и кожу (меланоциты) крысы-реципиента.



**Рис 2-10. Миграция и распределение клеток нервного гребня**

Экспрессированные гены AP-1, Wnt-1 Wnt-3 служили маркерами миграторных популяций НГ. Рост клонов НГ имел как признаки сходства, так и отличия от роста клонов НСК эктодермального происхождения. В отличие от суспензионных клонов НСК, большинство клонов НГ прикреплялось к подложке.

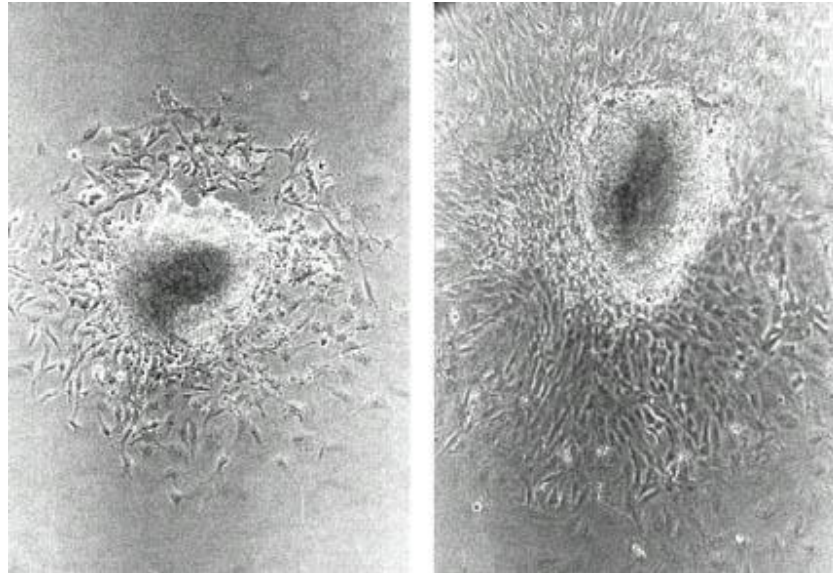
Клоногенная культура клеток НГ оказалась мультипотентной: из общего пула незрелых клеток удавалось получить нейроны, глию, шванновские клетки (периферические олигодендроциты), гладкомышечные клетки, хондроциты,

остеобласты, миобласты. В то же время из клоногенной культуры НСК не удавалось получать клетки НГ. Не известно, остаются ли какие-либо «резервы» незрелых клеток НГ в мозге взрослых животных и человека. Клоны НГ *in situ* сохраняли мультипотентность, поскольку «ядро» клона было изолировано слоями плотно собранных прогениторных клеток. Мультипотентность клонов НГ в культуре была меньше, чем при их трансплантации. Например, клоны НГ *in vitro* не дифференцировались в нейроны парасимпатических кишечных ганглиев. Однако они формировали химерный ганглий из донорских/реципиентных клеток при локальной пересадке в рыхлую соединительную ткань тонкого кишечника. В то же время только клоны НГ из головного мозга дифференцировались в мышцы и кости лица, а также строму тимуса *in situ*.

В середине эмбриогенеза нейроэпителиальная выстилка спинного мозга крысы сохраняла клоны провизорных клеток, из которых возникали как клоны НГ, так и суспензионные клоны НСК. Поэтому принято думать, что часть общих некоммитированных предшественников сохраняется в спинном мозге со стадии нервной трубки. В культуре только BMP-2, BMP-4 стимулировали образование клонов НГ из спинального нейроэпителия зародышей крыс. Не исключено, что высокое содержание BMP-2, BMP-4, генерируемое аортой, влияло на автономный нейрогенез цепочки симпатических ганглиев из мигрирующих клеток НГ. Автономный нейрогенез ганглиев из пришлых прогениторных популяций НГ имел место в сердце, лёгких, где локальная концентрация BMP высока, как и в аорте.

Клетки НГ в клонах экспрессировали N-кадгерин и кадгерин-6. Мигрирующие прогениторные клетки, покидавшие клон, окрашивались кадхерином-7 и кадхерином-11. Мигрирующие клетки НГ отличались экспрессией нового класса сигнальных G-белков - Rho ГТФ-азы. Смена молекул адгезии на поверхности клеток НГ происходила с помощью экспрессии двух Нох-генов: Msx1 и Msx2 (Linecum J.M., Fannon A., Song K. et al., 1998). Региональное включение Msx-1, Msx-2 опосредовало множество функций, в том числе закладку зубных зачатков и отростков верхнего нёба. Эти гены экспрессировались также в межфаланговой ткани конечностей, которая подвергалась апоптозу. В эпидермисе кожи, волосяных фолликулах гены Msx-1/Msx-2 контролировали численность клеток (число клеточных слоев) в ткани. Экспрессия

кадхерина-11 связана с появлением нового белка внутри клеток - бета-катенина, медиатора сигналов через кадхерин-11. Появление бета-катенина подготавливало почву для включения генов семейства Wnt.



**Рис 2-11 Фазово-контрастная микроскопия клеток НГ в культуре**

Клоногенный рост стволовых клеток НГ связан с тремя феноменами 1) самообмениваемостью клеток 2) рестрикцией дифференцировки прогениторных клеток 2) апоптозом, селектирующим выживание части прогениторных клеток. Если на уровне обновления и рестрикционной дифференцировки превалировал "инструкционный" механизм, то апоптоз использовал селекцию для отбора клеток. Без апоптоза невозможно регулируемое самообновление прогениторных клеток в клоне. Максимальную скорость пролиферации имели клоны, где соседние слои прогениторных клеток удерживались Delta-Notch взаимодействиями (Maynard T.M., Wakamatsu Y., Weston J.A., 2000 ). Три изоформы гена (Notch1, Notch2, Notch3) обеспечивали уникальную комбинацию рецепторов как на поверхности прогениторных клеток нервной трубки, НГ, сомитов, так и других производных экто-мезодермы (за исключением энтодермы) (Williams R., Lendhal U., Lardelli M., 1995 ). Серийный анализ генной экспрессии в клонах НГ показал, что максимально

экспрессируется мРНК Notch/Delta. Как и в случае НСК-клонов нейроктодермального происхождения Delta-Notch контакты являлись главным "вето" на остановку пролиферации прогениторных слоев. Плотная стыковка прогениторных клеток через Delta-Notch защищала клоны от «случайного» нейрогенеза. Нейрегулин стимулировал пролиферацию прогениторных клеток в нейросфере (Calaora V., Rogister B., Bismuth K., 2001). Механическая диссоциация сфер клеток НГ приводила к утрате плюрипотентности прогениторных клеток (Dorsky R., Moon R.T., Raible D.W., 2000). Особенность клонов НГ состояла в том, что стимуляция Delta-Notch, блокируя нейрогенез, активировала созревание шванновских клеток в периферических ганглиях (Morrison S.J., Perez S.E., Z.Qiao et al, 2000).

Методом конечных разведений было доказано, что диссоциированные прогениторные клетки содержат клон-иницирующие клетки. Фенотипически идентичные промигранторные прогениторные клетки имели разную генетическую потенцию. Фенотипическая гетерогенность прогениторных клеток внутри клонов сочеталась с высокой пластичностью клеток, которая проявлялась при трансплантации.

Нейрогенез из плюрипотентных клеток НГ шел через ту же цепочку генов, что и нейрогенез из НСК нервной трубки: коэкспрессия Wnt-1/Wnt-3 необходима для экспансии прогениторных популяций. В ряде ситуаций в цепочку включался Mash1 (для некоторых специализированных линий в сочетании с нейрогенами -Ngn1,Ngn2) (Ikeya M., Lee S.M., Johnson J.E. et al., 1997). Комбинации TGF-beta, BMP-2, BMP-4, bFGF, EGF индуцировали дифференцировку прогениторных клеток НГ в сенсорные нейроны, нейроны вегетативных ганглиев, гладкомышечные клетки, клетки проводящей системы.

Phox2b запускал дифференцировку прогениторных клеток НГ в адренэргические нейроны ганглиев. Через последнюю транскриптазу активировалась экспрессия генов ферментативной цепи окисления тирозина в гидрокси - медиаторы. Точные комбинации сигналов для индукции моноспецифической дифференцировки не опубликованы в открытой печати. Клоны НГ, изолированные из головного мозга, имели максимальную потенцию к дифференцировке в нейроны. Клоны НГ,



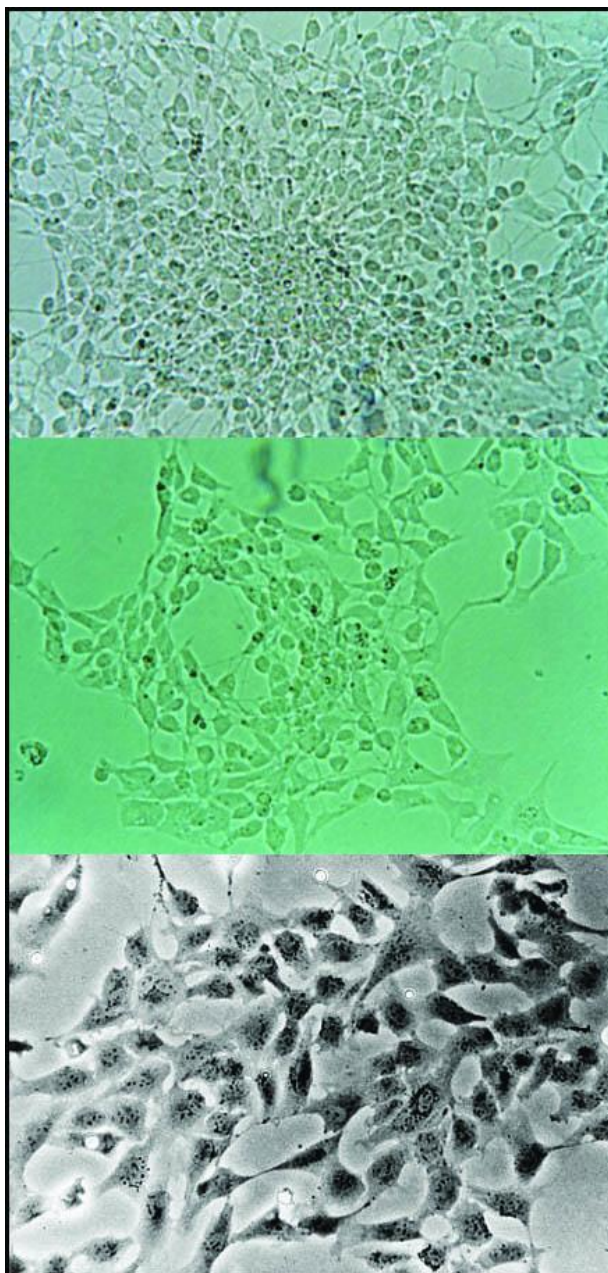
изолированные из ростральных отделов спинного мозга чаще всего дифференцировались в меланоциты.

В случае дифференцировки прогениторных клеток НГ в меланобласты у клеток формировался сложный комплекс рецепторов для длительной навигации. Во-первых, экспонировался рецептор *c-kit* для SCF. Мигрирующие предшественники меланоцитов вырабатывали SCF, который разрозненные клетки собирал в пласт. Часть клеток содержала два новых рецептора (*c-kit*- рецептор тирозиновой киназы и рецептор эндотелина-3 одновременно) (Guo C., Wherle-Haller B., Rossi J. et al., 1997). Многие клетки экспрессировали рецептор для PDGF. Синхронно активировалась экспрессия *Wnt1*, *Wnt3a*, а также транскриптазы MITF, необходимых для включения цепочки генов синтеза меланина (Pou L., Panthier J.J., Arnheiter H., 2000). Трансгенные мыши с лишней дозой гена *Wnt-1* имели гиперпигментацию кожи за счет увеличения численности меланоцитов. В прогениторных клетках НГ, мигрирующих в проводящую систему миокарда, активировалась транскриптаза HAND1 (Riley P.R., Gersenstein M., Dawson K. et al, 2000).

Подавляющая часть шванновских клеток периферической нервной системы возникала из стволовых клеток НГ. Сами резервы стволовых клеток для генерации новых шванновских клеток сохранялись в нервных волокнах, частично в спинном мозге. В эмбриогенезе первые предшественники олигодендроцитов в спинном мозге появлялись у зародышей человека 45 дня развития ( Rogister B., Ben-Hur T., Dubois-Dalcq M.,1999). Предшественники олигодендроцитов экспрессировали рецептор для PDGF. Характерен фокальный рост предшественников. Как *in vitro*, так и *in vivo* образование предшественников олигодендроцитов запускалось SHH. На первом этапе прогениторные клетки чаще созревали в астроглию, если в микроокружении преобладали следующие сигналы: PDGF, BMP-2/4, CNTF. Комбинация PDGF+ bFGF, или PDGF+GGF направляли рестрикционную пролиферацию прогениторных клеток в сторону олигодендроцитов. Переход к постмитотическому созреванию клеток связан с экспрессией *p27* и *p21* –ингибиторов циклин-зависимой киназы (Cdk). Механизм запуска миелинизации остается нерасшифрованным. Комбинация T3 и IGF-1 запускала экспрессию генов белков миелина. Если активировался ген MBP (myelin basic protein) и PLP, то ингибировался ген *Krox-24*. Трансплантация предшественников

олигодендроцитов в боковые желудочки резко увеличивала число донорских миелин+клеток в зонах демиелинизации мозга крыс. В отличие от НСК, предшественники олигодендроцитов более эффективно мигрировали по белому веществу и накапливались в участках демиелинизации ( Learish R.D., Brustle O., Zhang S.C. et al., 1999).

Важные последствия получил метод выделения высокоочищенной клоногенной культуры клеток НГ (Stemple D.L.,Anderson D.J.,1992, Morrison S.J., White P.M., Anderson D.J. et al, 1999). С помощью иммуносортинга культуру клеток НГ удалось до 80% обогатить стволовыми/прогениторными популяциями, удалив примесь эндотелия, гладкомышечных клеток, перицитов, шванновских и других «продвинутых» клеток. Стволовые клетки НГ удалось изолировать из нескольких источников: мозга зародышей, периферических нервов, из дорзальных ганглиев. Селективная среда, содержащая ростовые факторы, позволила значительно обогатить культуру прикрепленными к подложке клонами. Важнейшим поверхностным маркером стволовых клеток НГ является белок p75 - рецептор ростового фактора NTF3. Эта же популяция стволовых клеток не прокрашивалась антителами к периферину (P- фенотип) - одному из белков шванновских клеток. Выращенные в культуре клоны НГ отличались выраженной гетерогенностью. Миграторные прогениторные клетки прикреплялись к пластику и давали характерный монослой распластанных клеток.



**Рис 2-12. Прекофлуэнтная культура прикреплённых нейромезенхимальных клеток под фазовоконтрастным микроскопом.**

Часть клонов удавалось многократно пассировать, причем клетки внутри сфер сохраняли : а) способность инициировать клонообразование, б) плюрипотентность (способность дифференцироваться в нейроны, глию, шванновские клетки, миофибробласты и даже хрящ. Обычно клоны НГ в культуре подвергались смешанной

дифференцировке. Моно-дифференцировка клонов НГ в культуре в нейроны шла с помощью комбинации BMP-2 и BMP-4. BMP индуцировал экспрессию Mash-1 в постмитотических клетках. Монодифференцировку клонов НГ в глию получали добавлением GGF (нейрегулина). Гладкомышечные клетки из прогениторных популяций НГ получали добавлением TGF-beta. Glial growth factor (GGF) - митоген и индуктор образования шванновских клеток - ингибировал дифференцировку прогениторных клеток НГ в нейроны. При пересадке клонов стволовых клеток НГ в мозг зародышей донорские клетки ограниченно дифференцировались в холинэргические нейроны как в головном мозге, так и на периферии (White P.M., Morrison S.J., Orimoto K. et al., 2001). Другие исследователи также отмечали ограниченную пластичность клонов НГ при их пересадке в мозг и другие ткани реципиента (по сравнению с клонами НСК, выделенных из перивентрикулярных отделов мозга) (Shah N.M., Anderson D.J., 1997). Исключение составляли стволовые клетки нейроэпителиальной выстилки спинного мозга, которые содержали предшественники ЦНС и клеток периферической нервной системы. В общей массе изолированных клеток встречались клоны, которые окрашивались как на нестин, виментин, так и P75 (Mujtaba T., Mayer-Proschel M., Rao M.S., 1998). Предполагается, что часть стволовых клеток спинальной части НГ мигрировала в нервную трубку. Поэтому потенции к регенерации спинного мозга выше, чем головного мозга за счет химеризации клетками нейромезенхимы.

Важно подчеркнуть, что потенции стволовых клеток НГ в генерации костно-хрящевых структур черепа, тимуса, щитовидной железы, ганглиев, проводящей системы сердца уникальны и не могут быть замещены другими фетальными клетками. Пересадки НСК эктодермального происхождения не в состоянии заменить функций прогениторных клеток НГ. Вторая важнейшая особенность прогениторных клеток НГ - это высокая скорость и плотность миграции клеток на рекордные расстояния. Уникальные возможности нейромезенхимальных клеток в плане направленной миграции в организме привлекают внимание медиков с целью репарации клеточных дефектов тимуса, уродств костно-мышечной системы лица, а также репарации проводящей системы сердца.

Поскольку периферическая часть нервной системы формирует значительное число адренэргических нейронов для симпатических ганглиев и коры надпочечников, актуальными остаются поиски " программ", эффективно управляющих монодифференцировкой постмитотических прогениторных клеток НГ. Практически каталогизирован список генов-участников : Ret, Phox2a, Phox2b, ген тирозингидроксилазы (Young H.M., Ciampoli D., Hsuan J. et al., 1999).

Наследственные дефекты миграции клеток НГ только начали изучаться. Например наследственная болезнь Ваарденбурга связана с дефектами пигментации кожных покровов и отсутствием вегетативных ганглиев в кишечнике на почве мутации рецептора к эндотелину-3 (Newgreen D.F., Murphy M., 2000 ). В настоящее время стволовые клетки НГ нашли новое неожиданное применение в лечении наследственной мышечной дистрофии, обусловленной дефектом гена дистрофина. Хорошо известно, что у пациентов с дистрофией Дюшенна избирательно поражаются мышцы конечностей, но не лица, глаз и гортани. Оказалось, что вся мышцы лица и шеи, возникшие из клеток НГ, синтезируют утрофин (эмбриональный дериват дистрофина) для функции. Поэтому все мышцы лица и шеи пациентов остаются неповрежденными. В настоящее время предпринимаются пересадки фетальных миобластов, лабораторно полученных из клеток НГ с целью реконструкции мышц пациента из донорских клеток, резистентных к заболеванию. (Black H., 2000). Для целей трансплантации получены первые бессмертные линии стволовых клеток НГ (Rao M.S., Anderson D.J., 1997).

## 16. Литература

- Коржевский Д.Е. Проллиферативные зоны эпителия в хориодных сплетениях мозга эмбрионов, *Морфология*, 1999, 115, 38-41
- Abe K., Saito H., Effects of growth factors on the CNS function, *Pharm.Res.*, 2001, 43, 308-14
- Acampora D., Gulisano M., Broccoli V. et al., Otx genes in brain morphogenesis, *Prog Neurobiol.*, 2001, 64, 69-95
- Altmann C.R., Brivanlou A.H. Neural patterning in the vertebrate embryo; *Int.Rev. Cytol.*, 2001, 203, 447-82
- Anton E.S., Marchionni M.A., Lee K.F. et al., Role of GGF signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex, *Development*, 1997, 124, 719-26; *Dev Biol*, 2001, 229:15-30
- Bain G., Kitchens D., Yao M. et al., ESC express neuronal properties in vitro, *Dev. Biol.*, 1995, 168, 342-57
- Barr F.J., Fitzgerald J.C., Ginsberg J.P. et al., Predominant expression of alternative Pax3/Pax7 forms in myogenic and neural tumor cell lines, *Cancer Res.*, 1999, 59, 5443-8
- Bartlett P.F., Reid H.H., Bailey K.A. et al, Mouse neuroepithelial cells immortalized by the c-myc oncogene, *Proc.Natl.Acad.Sci.US*, 1988, 85, 3255-59
- Beddington R.S., E.J. Robertson, Axis development and early asymmetry in Mammals, *Cell*, 1999, 96, 195-209
- Benniger Y., Marino S., Hardegger R. et al., Differentiation and histological analysis of ESC-derived neural transplants in mice, *Brain Pathol.*, 2000, 10, 330-41
- Besso Y., Miyoshi G., Sakata R. et al., Hes- repressor gene regulated by Notch and expressed in the mesoderm, *Genes Cells*, 2001, 6, 175-86
- Bjorklund A., Lindvall O., Cell Replacement Therapy for CNS disorders, *Nature Neurosci.*, 2000, 3, 597-404
- Bjornson C.R., Rietze R.L., Reynolds B.A. et al., Turning brain into blood: a hemopoietic fate adopted by adult NSC in vivo, *Science*, 1999, 283, 534-37
- Black H., Eye and Muscular Dystrophy: extraocular muscle may hold a key to treatment; *The Scientist*, 2000, 14, 24-26

Blaschke A.J., Staley K., Chun J., Widespread programmed cell death in proliferating and postmitotic regions of fetal cerebral cortex, *Development*, 1996, 122, 1185-74

Boncinelli E., A. Mallamaci, Hox-genes in vertebrate gastrulation; *Current Opinion Genet. Develop.*, 1995, 5, 619-27

Brooker G., Kalloniatis M., Russo V. et al., Endogenous IGF1 regulates the neuronal differentiation of adult stem cells, *J. Neurosci. Res.*, 2000, 59, 332-41

Brustle O., Choudry K., Karram K. et al., Chimeric brain generated by intraventricular transplantation of fetal human brain cells into embryonic rats., *Nature Biotechnol.*, 1998, 16, 1040-44.

Brustle O., Jones K.N., Learish R.D. et al., ESC-derived glial precursors: a source of myelinating transplants, *Science*, 1999, 285, 7554-56

Brustle O., Spiro C., Karram K. et al., In vitro generated neural precursors participate in mammalian brain development, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 1997, 94, 14809-814

Calaora V., Rogister B., Bismuth K. Et al, Neuregulin signaling regulates neural precursor growth and the generation of oligodendrocytes in vitro, *J. Neurosci.*, 2001, 21, 4740-51

Caldwell M.A., He X., Wilkie N. et al., Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres, *Nature Biotechnol.*, 2001, 19, p.475 - 80

Cau E., Gradwohl G., Casasosa S. et al., HES genes regulate sequential stages of neurogenesis in the olfactory epithelium, *Development*, 2000, 127, 2223-32

Carpenter M.K., Cui X., Hu Z., et al., In Vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells, *Exp. Neurol.*, 1999, 158, 265-78

Carpenter M.K., Inokuma M.S., Denham J. et al., Enrichment of neurons and neural precursors from human ESC, *Exp. Neurol.*, 2001, 172, 383-97

Catala M., Embryonic and fetal development of structures associated with cerebro-spinal fluid in man and other species. Part I. The ventricular system > meninges and chorioid plexuses, *Arch. Anat. Cytol. Pathol.*, 1998, 46, 153-69

Chanas-Sacre G., Rogister B., Moonen G. et al., Radial glia phenotype, *J. Neurosci. Res.*, 2000, 61, 357-63

Chapman G., Remiszewski J.L., Webb G.C. et al., The mouse Hox Gene Gbx2: genomic organization and expression in pluripotent cells in vitro and in vivo, *Genomics*, 1997, 46, 223-33

Cheng Y., Cheung M., Abu-Elmagd M.M. et al., Sox10 transcription factor expressed in both early neural crest cells and CNS, *Brain Res. Dev. Brain*, 2000, 121, 233-41

Christiansen J.H., Coles E.G., Wilkinson D.G., Molecular control of neural crest formation, migration and differentiation, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2000, 12, 719-24

Ciccolini F., Identification of two distinct types of multipotent neural precursors that appear sequentially during CNS development, *Mol. Cell Neurosci.*, 2001, 17, 895-907

Clarke D.L., Johansson C.B., Wilbertz J. et al., Generalized potential of adult NSC, *Science*, 2000, 288, 1660-63

Clouthier D.E., Williams S.C., Yanagisawa T.E. et al, Signal pathway crucial for craniofacial development revealed by endothelin-1 receptor deficient mice. *Dev. Biol.*, 2000, 217, 10-24

Conti L., Sipione S., Magrassi L. et al., SHH signalling in differentiating neural progenitor cells, *Nature Neurosci.*, 2001, 4, 579- 86.

Dalstrand J., Lardelli M., Lendahl U. Nestin correlates with the CNS progenitor cell state of developing CNS, *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 1995, 84, 109-29

Danelian P.S., McMahon A.P. En-1 as a target of the Wnt-1 signalling pathway in vertebrate midbrain development, *Nature*, 1996, 383, 332-4

Daniel-Lacorazza H., Flax J.D., Snyder E.Y. et al., Expression of human beta-hexosaminidase in mouse brains upon engraftment of transduced progenitor cells, *Nature Med.*, 1996, 2, 424-429

Dettori M., Gross M.K., Goulding M., Factor Foxd3 suppresses interneuron differentiation and promotes neural crest cell fates, *Development*, 2001, 128, 4127-38

Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo et al, Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 1999, 97, 1-20

Dorsky R., Moon R.T., Raible D.W., Environmental signals and cell fate specification in premigratory neural crest, *BioEssays*, 2000, 22, 708-16

Etcheveres H.C., Couly G., Vincent C. et al, Anterior cephalic neural crest is required for forebrain viability, *Development*, 2000, 126, 3533-43

Etchevers H.C., Vincent C., Le Douarin N.M. et al., The cephalic neural crest provides pericytes and SMC to all blood vessels of face and forebrain., *Development*, 2001, 128, 1059-68



Finley M.F.A., Devata S., Huettner J.E. BMP-4 inhibits neural differentiation of murine ESC, *J.Neurobiol.*,1999, 40, 271-87

Flax J.D., Aurora S., Yang C. et al, Engraftable human NSC respond to development cues and express foreign genes, *Nature Biotechnol*, 1998, 16, 1033-39

Fricker-Gates R.A., Winkler C., Kirik D. et al., EGF infusion stimulates the proliferation and migration of embryonic progenitor cells transplanted in the rat brain, *Exp.Neurol.*,2000, 165,237-47

Gabrion J.B., Herbute S., Bouille C. et al., Ependymal and chorioidal cells in culture: characterization and functional differentiation, *Microsc Res Tech* 1998, 41, 124-57

Gage F. Mammalian NSC, *Science*, 2000,287, 1433-38

Gaiano N., Nye J.S., Fishell G. Radial glial identity is promoted by Notch signalling in the murine forebrain; *Neuron*, 2000, 26, 395-404

Galli R., Borello U., Gritti A. et al., Skeletal myogenic potential of human and mouse NSC, *Nature Neurosci.*, 2001, 3, 986-91.

Gerloff G., Knoth R., Volk B., Cytoplasmic expression of leu-4 (CD3) antigen in developing Purkinje cells in the rat cerebellum, *Neuropathol. Appl. Neurobiology*,1993, 19, 313-23

Gershon A.A., Ridnick J., Kalam L. et al., Xdbx inhibits neuronal differentiation in the developing embryo, *Development*, 2000, 127, 2945-54

Gokhan S., Song Q., Mehler M, Generation and Regulation of Developing Immortalized Neural Cell Lines, In: *Acomparison to Methods in Enzymol.*,1998, 16, 345-58

Grapin-Botton A., Majithia A.R., Melton D.A., Key events of pancreas formation are triggered in gut endoderm by ectopic expression of pancreatic regulatory genes, *Genes Dev.*, 2001,15, 444-54

Guo C., Wehrle-Haller B., Rossi J. et al., Autocrine regulation of neural crest cell development by SCF, *Dev. Biol.*, 1997, 184, 61-9

Hallonet M., Hollemann T., Pieler T. et al., Vax1 directs development of the basal forebrain and visual system, *Gene Dev.*, 1999, 13, 3106-14

Han W., Ye Q, Morre M.A., A soluble form of human Delta-1 inhibits differentiaaion of hematopoietic progenitors , *J.Biol.Chem.*,1999, 274, 7238-44

Hartfuss E., Galli R., Heins N. et al., Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia, *Dev. Biol.*, 2001, 229, 15-30

Haysay A.C., Barber D.F., Douglas N. et al., Signals involved in gamma/delta T-cell versus alpha-beta T cell commitment, *Development*, 2000, 127, 2323-32

Helms A.W., Abney A.L., Ben-Arie N. et al. The control of Math-1 expression in the developing nervous system, *Development*, 2000, 127, 1185-96

Henion P.D., Blyss G., Luo R. et al., Avian transitin expression mirrors glial cell fate restrictions during neural crest development, *Dev. Dyn.*, 2000, 218, 150-59

Herrera D.G., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A., Adult-derived neural precursors transplanted into multiple regions in the adult brain, *Ann. Neurol*, 1999, 46, 867-77

Higuchi M., Kiyama H., Hayakawa T. et al, Differential expression of Notch-1 and Notch-2 in developing and adult brain, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 1995, 29, 263-72

Hodges H., Veizovich T., Bray N. Et al., Conditionally immortal neuroepithelial stem cell grafts reverse age-related memory impairment in rats, *Neurosci.*, 2000, 101, 945-55

Howkes R., Faulkner-Jones D., Tam P. et al., Pattern formation in the cerebellum of murine embryonic stem cell chimeras, *Eur. J. Neurosci.*, 1998, 10, 790-93

Huang H.P., Liu M., El-Hodiri H.M. et al., Regulation of the pancreatic islet-specific genes NeuroD by neurogenin-3., *Mol. Cell Biol*, 2000, 20, 3292-397

Hulspas R., Quesenberry P.J., Characterization of neurosphere cell phenotypes by flow cytometry, *Cytometry*, 2000, 40, 245-50

Iacovitti L., Stull N.D., Jin H., Differentiation of human dopamine neurons from embryocarcinoma stem cell line, *Brain Res.*, 2001, 912, 99-104

Ikeya M., Lee S.M., Johnson J.E. et al., Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors, *Nature*, 1997, 389, 966-70

Jensen J., Heller R.S., Funder-Nielsen T. et al., Independent development of pancreatic alpha- and beta-cells from Ngn3-expressing precursors: a role for the Notch pathway in repression of premature differentiation, *Diabetes*, 2000, 49, 163-76

Kaibushi K., Nakamura S., Casarosa S. et al., Transcription Factors Mash-1 and Prox-1 delineate early steps in differentiation of NSC in developing CNS, *Development*, 1999, 126, 443-56

Kageyama R., Ohtsuka T., The Notch-Hes pathway in mammalian neural development, *Exp. Cell Res.*, 1999, 9, 179-88

Kallos M.S., Behie L.A., Inoculation and growth conditions for high-cell-density expansion of mammalian NSC in suspension bioreactors, *Biotechnol. Bioengineering*, 1999, 63, 473-83

Kallos M.S., Behie L.A., Vescovi A.L., Extended Serial passaging of mammalian NSC in suspension bioreactors, *Biotechnol. Bioengin.* 1999, 65, 589-99

Kalyani A., Hobson K., Rao M.S., Neuroepithelial stem cells from the embryonic spinal cord: characterization and clonal analysis, *Dev. Biol.*, 1997, 186, 202-23

Kato K., O'Dowd D.K., Fraser S.E. et al., Heterogenous expression of multiple patterning genes by single cells from the chick hindbrain, *Dev. Biol.*, 1997, 191, 259-69

Kitada M., Chakraborty S., Matsumoto S. et al., Differentiation of choroid plexus ependymal cells into astrocytes after grafting into the pre-lesioned spinal cord in mice, *Glia*, 2001, 36, 364-74

Kondo T., Raff M., Hes5 and the timing of oligodendrocyte differentiation, *Development*, 2000, 127, 2989-98

Kornblum H.I., Yanni D.S., Easterday M.C. et al., Expression of EGF receptor family members Erb2, Erb3 and Erb4 in germinal zones of the developing brain and in cultured neurospheres, *Dev Neurosci.*, 2000, 22, 15-24

Kruger M., Mennerich D., Fees S., et al, SHH as survival factor for hypoxial muscles during mouse development, *Development*, 2001, 128, 743-52

Kuan C.Y., Elliot E.A., Rakic P., Restrictive clonal allocation in the chimeric mouse brain., *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 1997, 94, 2800-2804

Kuliev A., Kucharenko V., Verlinsky Y. et al, Expression of Hox-genes in human preimplantation development and in embryos with chromosomal aneuploidies; *J Assist Reprod Genet* 1996, 13, 177-81

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, 156, 333-44

Kuroda K., Tani S., Tamura K. et al., Notch signalling mediated by Rbp-J inhibits Myo D expression and myogenesis, *Curr. Biol.*, 1999, 13, 707-10

Kwang S.J., Brugger S.M., Lazik A. et al., Msx is an intermediate downstream effector of Pax3 in the development of the murine cardiac neural crest, *Development*, 2002, 129, 527-38

LaBonne C., Bronner-Fraser M., Molecular Mechanisms of Neural Crest Formation, *Ann. Rev. Cell Biol.*,1999,15, 81-112

LaMantia A.S., Bhasin N., Rhodes K. et al, Mesenchymal/epithelial induction mediates olfactory path formation, *Neuron*, 2000, 28, 411-25

Laywell E.D., Rakic P., Kukekov V.G. et al., NSC isolated from the adult postoperative brain biopsy, *Proc.Natl.Acad.Sci US*, 2000, 97, 13883-88

Learish R.D.,Brustle O., Zhang S.C. et al, Intraventricular transplantation of oligodendrocyte progenitors into fetal myelin mutant results in widespread formation of myelin,*Ann.Neurol.*,1999,46, 716-22

Lee J.C., Smith S.B., Watada H. et al. Regulation of the pancreatic pro-endocrine gene neurogenin3, *Diabetes*, 2001, 50, 928-36

Lee S.K., Pfaff S.L., Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord, *Nature Neurosci.*, 2001, 4, 1183- 91

Leventhal C., Raffi S., Raffi D., et al, Endothelial trophic support of neuronal production and recruitment from the adult mammalian subependyma, *Mol.Cell Neurosci.*,1999, 13, 450-64

Levinson S.W., Rothstein R.P.,Brazel C.Y. et al.,Selective apoptosis within the rat subependymal zone., *Dev. Neurosci.*, 2000, 22, 106-15

Leventhal C., Raffi S., Raffi D. et al., Endothelial trophic support of neuronal production and recruitment from the adult mammalian subependyma, *Mol Cell Neurosci.*, 1999, 13, 450-64

Li J.,Molkentin J.D., Colbert M.,Retinoic acid inhibits cardiac neural crest migration by blocking c-jun activation,*Dev. Biol.*,2001, 232, 351-61

Lillien L., Raphael H., BMP and FGF regulate the development of EFG-responsive neural progenitor cells, *Development*, 2000, 127, 4993-5005

Lim D.A., Fishell G.J., Alvarez-Buylla A., Postnatal mouse subventricular zone neuronal precursors can migrate and differentiate within multiple levels of the developing neuroaxis, *Proc.Natl.Acad.Sci.US*,1997,94, 14832-36

Lim D.A., Tramontin A.D.,Trevejo J.M. et al., Noggin antagonize BMP signalling to create a Niche for Adult Neurogenesis, *Neuron*, 2000, 28, 713-26

Lin J.C., Cepko C.L., Biphasic dispersion of clones containing Purkinje cells and glia in the developing chick cerebellum,*Dev.Biol.*,1999,211, 177-97

Lopez-Coviela I., Bersa B., Krauss R. et al., Induction and Maintenance of Cholinergic Phenotype in the CNS by BMP-9, *Science*, 2000, 289, 313-16.

Lowell S., Jones P., Le Roux et al., Stimulation of human epidermal differentiation by Delta-Notch signalling at the boundary of stem cell clusters, *Curr.Biol.*, 2000, 10, 491-500

Lumelsky N., Blondel O., R. McKey et al. Differentiation of Embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to Pancreatic Islets, *Science*, 2001, 292, 126-28

Lundberg C., Martinez-Serrano A., Cattaneo E. Et al., Survival, integration and differentiation of NSC lines after transplantation to the adult rat striatum, *Exp.Neurol.*, 1997, 145, 342-60

MacKenzie A., Ferguson M.W., Sharpe P.T., Hox-7 expression during murine craniofacial development, *Development*, 1991, 113, 601-11

Mathis L., Nicolas J.F., Cluster formation of LacZ-labeled NSC grafted NSC into mice brain, *Dev.Dyn.*, 2000, 219, 277-81

Mathis L., Bonnerot C., Puelles L. et al., Retrospective clonal analysis of the cerebellum using LacZ mouse mosaics, *Development*, 1997, 124, 4089-104

Mathos L., Bonnerot C., Puelles L. et al., Clonal analysis of the cerebellum using LacZ mouse mosaics, *Development*, 1997, 124, 4089-4114

Mayanil C.S., George D., Mania-Farnel B. et al., Overexpression of murine Pax-3 increases NCAM polysialylation in a human medulloblastoma cell line, *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 23259-66

Mehler M.F., Gokhan S., Postnatal cerebral cortical multipotent progenitors, *Brain Pathol.*, 1999, 9, 515-26

Mentlein R., Kendall M., The brain and thymus have much in common: a functional analysis of their microenvironment, *Development*, 1999, 126, 3533-43

Momma J., Johansson C., Frisen J., Get to know your stem cells, *Curr.Opin.Neurobiology*, 2000, 10, 45- 49

Morrison S.J., Perez S.E., Qiao Z. et al., Transient Notch activation initiates irreversible Switch from Neurogenesis to Gliogenesis by neural crest stem cells, *Cell*, 2000, 101, 499-510

Morrison S.J., White P.M., Anderson D.J. et al, Prospective identification, isolation by flow cytometry of multipotent mammalian neural crest stem cells, *Cell*, 1999, 96, 737-49

Murphy M., Drago J., Bartlett P.F. et al., bFGF stimulates the proliferation and differentiation of neural precursor cells in vitro, *J. Neurosci. Res.*, 1990, 25, 463-75.

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

Nakamura Y., Sakakibara S., Miyata T. et al., Hes-1 is a repressor of the neuronal commitment of CNS stem cells, *J.Neurosci.*,2000,20, 283-93

Nardelli J., Thiesson D., Fujiwara Y. et al., Expression of GATA-2 and GATA-3 during CNS development in the mouse, *Dev. Biol.*, 1999, 210, 305-21

Newgreen D.F., Murphy M., Neural crest cell outgrowth cultures and the analysis of cell migration, *Methods Mol. Biol.*,2000, 137, 201-11

Nieto M., Schuurmans C., Britz O, et al, Neural bHLH genes control the neuronal vs glial fate decision in cortical progenitors, *Neuron*, 2001, 29, 401-13

Noctor S.C., Flint A.C., Weissman T.A. et al., Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex, *Nature*, 2001, 229, 714-20

Okabe S., Forsberg-Nilsson K., Spiro A.C., Development of neuronal precursor cells and functioning postmitotic neurons from ESC,*Mech.Dev.*,1996, 59, 89-102

Oldakr M., Grzela T., Lazartchuk M. et al., Clinical aspects of disrupted Hedgehog signalling, *Int.J. Mol. Med.*, 2001, 8, 445-52

Olsson M., BjerregaardK.,Winkler C. et al., Incorporation of mouse neural progenitors transplanted into the rat brain is developmentally regulated and dependent on regional and adhesive properties, *Eur. J. Neurosci.*, 1998, 10, 71-85

Ono K, Takii T, Onozaki K. et al., Migration of hemopoietic stem cells into adult mouse brain parenchyma, *Biochem. Biophys. Res. Comms.*, 1999, 262, 610-14

Ohtsuka T., Ishibashi M., Gradwohl G. et al., Hes1 and Hes5 as Notch effectors in mammalian neuronal differentiation, *EMBO J.*, 1999, 18, 2198-207

Palmer T.D., Willhoite A.R., Gage F., Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis, *J Comp. Neurol.*, 2000 , 425, 479-94

Pattyn A., Goridis C., Brunet J.F., Specification of the central noradrenergic phenotype by the Phox2, *Mol.Cell Nuerosci.*, 2000, 15, 235-43

Philips M.F., Mattiasson G., Weloch T. et al., Neuroprotective and behavioural of nerve growth factor –transfected hippocampal progenitor cells after transplantation in the adult rat brain., *J.Neurosurg.*,2001, 94, 765-74

Piper D.R., Mujtaba T., Rao M.S. et al., Immunocytochemical and physiological characterization of cultured human neural precursors, *J. Neurophysiol*, 2000, 84, 534-48

Pou L., Panthier J.J., Arnheiter H., Signalling and transcriptional regulation in the neural crest-derived melanocyte lineage: interaction between KIT and MITF, *Development*, 2000, 127, 5379-89

Pratt T., Vitalis T., Warren N. et al., A role for Pax-6 in the normal development of dorsal thalamus and its cortical connections, *Development*, 2000, 127, 5167-78

Price J., Williams B., Neural stem cells, *Curr. Opinion Neurobiol.*, 2001, 11, 564-87

Przyborsli S., Knowles B., Ackerman S., Embryonic phenotype of Unc5h3 mutant mice suggests chemorepulsion during the formation of the rostral cerebellar boundary, *Development*, 1998, 125, 41-50

Przyborsky S.A., Morton I.F., Wood A. et al., Developmental regulation of neurogenesis in the pluripotent human embryonic carcinoma cell line NTERA-2, *Eur.J.Neurosci.*, 2000, 12, 3521-28

Pundt L.L., Jorn E.A., Conrad J.A. et al., Organization and histochemical phenotype of human fetal cerebellar cells following transplantation into the cerebellum of nude mice, *Cell Transpl.*,1997, 6, 479-89

Qian X., Shen Q., Temple S. et al., Timing of CNS Cell Generation: A Programmed Sequence of Neuron and Glial Cell Production from Isolated Murine Cortical Stem Cells, *Neuron*, 2000,28, 69-80

Rakic C., Clonal expansion of cells in cerebral cortex, . *Novartis Found Symp.*, 2000, 228, 30-42

Rao M.S., Anderson D.J., Immortalization and controlled in vitro differentiation of murine multipotent neural crest stem cells, *J. Neurobiol.*,1997, 32, 722-46

Rao M.S., Mattson M.P., Stem cells and aging: expanding the possibilities, *Mech.Aging Developm.*,2001,122, 713-34

Rao Y., Wu Y.Y. , Neuronal migration and the evolution of human brain, *Nature Neuroscience*, 2001, 4, 860-61

Reynolds B.A., Weiss S., Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of an adult mammalian CNS, *Science*, 1992, 255, 1707-10

Renoncourt Y., Carroll P., Filippi P. et al., Neurons derived in vitro from ES cells express homeoproteins characteristic of moto- and interneurons, *Mech. Dev.*, 1998, 79, 185-97.

Rietzke R.L., Vacanis H., Bresker G.F. et al., Purification of a pluripotent NSC from adult mouse brain, *Nature*, 2001, 412, 735-38

Riley P.R., Gersenstein M., Dawson K. et al, Early exclusion of hand1-deficient cells from left ventricular myocardium in chimeric mouse embryos, *Dev. Biol*, 2000, 227, 156-68.

Robel L., Ding M., James A.J., bFGF increases Otx2 expression in precursor cells from mammalian telencephalon, *J. Neurosci.*, 1995, 12, 7879-91

Rogister B., Ben-Hur T., Dubois-Dalcq M. From NSC to myelinating oligodendrocytes, *Mol.Cell.Neurosci.*, 1999, 14, 287-300

Rosario C.M., Yandava B.D., Kosaras B. et al., Differentiation of engrafted multipotent neural progenitors towards replacement of missing granule neurons in meander tail cerebellum may help determine the locus of mutant gene action, *Development*, 1997, 124, 4213-24

Rowitch D.H., S-Jaques B., Lee S.M. et al., SHH regulates proliferation and inhibits differentiation of CNS precursor cells, *J. Neurosci. ,* 1999, 19, 8954-65.

Schonemann M.D., Ryan A.K., McEvelly R.J. et al, Development and survival of the endocrine hypothalamus and posterior pituitary gland requires the Brn-2, *Genes Dev.*, 1995, 9, 3122-35

Rubio F.J., Bueno C., Villa A. et al, Genetically perpetuated human NSC engraft and differentiate into the adult mammalian brain, *Mol.CeIL Neuroscience*, 2000, 16, 1-13

Ruffins S., Bronner-Fraser A.M., A critical period for conversion of ectodermal cells to a neural crest cells, *Dev.Biol.*, 2000, 218, 13-20

Schimazaki T., Arsenjevic Y., Ryan A.K. et al., Role of Brn-4 in the regulation of striatal neuron precursor differentiation, *EMBO*, 1999, 18, 444-56

Schroeder T. Just U., Notch signalling via rbp-j promotes myeloid differentiation, *Blood*, 2000, 95, 1616-25



Shah N.M., Anderson D.J., Integration of multiple instructive cues by neural crest stem cells reveals cell-intrinsic biases in relative growth factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 1997, 94, 11369-74

Seeds N.W., Basham M.E., Haffke S.P. et al., Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 1999, 96, 14118-23.

Snyder E., Grafting immortalized neurons to the CNS, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 1994, 4, 742-51

Snyder E.Y., Neural transplantation: an approach to cellular plasticity in developing CNS, *Sem. In Perinatology*, 1992, 16, 106-22

Snyder E.Y., Yoon C., Flax J.D. et al., Multipotent neural precursors can differentiate toward replacement of neurons undergoing targeted apoptotic degeneration in adult mouse neocortex, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 1997, 94, 11663-68

Stemple D.L., Mahanthappa N.K., Neural stem cells are blasting off *Neuron*, 1997, 18, 1-14

Stemple D.L., Anderson D.J., Isolation of stem cell for neuron and glia from the mammalian neural crest, *Cell*, 1992, 71, 973-85

Schwitzgebel V.M., Scheel D.W., Connors J.R. et al., Expression of Ngn3 in islet precursors in the pancreas, *Development*, 2000, 127, 3533-42

Stull N.D., Iakovitti L., SHH and FGF8: signals for differentiation of a DOPA-phenotype in mouse and human neurons in culture, *Exp. Neurol.*, 2001, 169, 36-43.

Suslov O.N., Kukekov V.G., Laywell E.D. et al., *J. Neurosci. Methods*, 2000, 96, 57-61

Takahashi J., Palmer T.D., Gage F.H., Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived NSC cultures, *J. Neurobiol.*, 38, 65-81

Tan-Pertel H.T., Walker L., Bowning D., Notch signalling enhance survival and alters differentiation of myeloblasts, *J. Immunol.*, 2000, 165, 4428-36

Taylor R.M., Snyder E.Y., Widespread engraftment of neural progenitor and stem-like cells throughout the mouse brain, *Transpl. Proc.*, 1997, 29, 845-47

Tief K., Schmidt A., Aguzzi A. et al., Tyrosinase is a new marker for cell populations in the mouse neural tube, *Dev. Dyn.*, 1996; 205, 445-56

Tropepe V., Hitoshi S., Sirard C. Et al, Direct neural fate specification from ESC: f- primitive mammalian NSC formation through default mechanism, *Neuron*, 2001, 30, 65-78

Ushida N., Buck D.W., Weismann I.L. et al., Direct isolation of human CNS stem cells, *Proc.Natl.Acad.Sci. US.*,2000, 97, 14720-25

Vaccarino F.M., Ganat Y., Zhang Y. et al., Stem cells in neurodevelopment and plasticity, *Neuropsychopharmacology*, 2001, 25, 805-15

Veizovic T., Beech J.S., Stroerner R.P. et al., Resolution of stroke deficits following contralateral grafting of conditionally immortalized neuroepithelial stem cells, *Stroke*,2001, 32, 1012-19

Vescovi A.L., Snyder E.Y., Establishment and properties of NSC clones:plasticity in vitro and in vivo, *Brain Pathol*,1999, 9, 569-98.

Villa A., Snyder E.Y., Vescovi A.L. et al.,Establishment and properties of a growth factor-dependent perpetual NSC line from the human CNS, *Exp. Neurol.*,2000, 161, 67-84

Virley D., Ridely R.M., Sinden J.D., Primary CA1 and conditionally immortal MHP36 cell grafts restore conditional discrimination learning and recall in marmosets after lesion of hippocampal CA1 field, *Brain*, 1999, 122, 2321-35.

Vriz S., Joly C., Boulekbache H. et al., Zygotic expression of the Sox19 -HMG box containing genes involved in CNS development *Mech Dev.*, 1999, 86,197-201

Ushida N., Buck D.W., Weismann I.L. et al., Direct isolation of human CNS stem cells, *Proc.Natl.Acad.Sci. US.*,2000, 97, 14720-25

Yandava B.D., Billingham L.L., Snyder E.Y.,Global cell replacement is feasible via NSC transplantation:evidence from the demyelinated shiverer mouse brain, *Proc.Natl.Acad.Sci.US*, 1999,96,7029-34

Wang H., Liu F., Development restriction of LIM-transcription factor Islet-1 expression to cholinergic neurons in the rat striatum, *Neuroscience*, 2000, 103, 999-1016

Wang W., Luskin T., Otp gene plays an essential role in the specification of neuronal cell lineages in the developing hypothalamus, *Dev.Biol.*, 2000, 227, 432-49

Wang H., Liu F., Development restriction of LIM-transcription factor Islet-1 expression to cholinergic neurons in the rat striatum, *Neuroscience*,103, 999-1016

Wegner M., Expression of transcription factors during oligodendroglial development, *Microsc. Res. Tech.*, 2001, 52, 746-52

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

Wilkinson D.C. Multiple roles of Eph receptors and ephrins in neural development; *Nature Neurosci. Rev.*, 2001,2,155-164

Yao M., Bain G., Gottlieb D.L., Neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells in defined media, *J.Neurosci. Res.*, 1995, 41, 792-804

Young H.M., Ciampoli D., Hsuan J. et al., Expression of Ret, P75, Phox2a-, Phox2b- and tyrosine hydroxylase by undifferentiated neural crest-derived cells., *Dev. Dyn.*,1999, 216, 137-52

Yuki N., Sakakibura S., Takaki M. Gene Hes-1 as a repressor of NSC commitment of CNS stem cells, *J. Neurosci.*, 2000, 20, 283-93

Zhang S., Ge B., Duncan J.D., Tracing human oligodendroglial development in vitro, *J.Neurosci.Res.*, 2000, 59, 421-9

Zhang S.C., Wernig M., Thomson J.A. et al, In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human ESC, *Nature Biotechnol.*,2001, 19, 1117-8

Zhong W.,Jiang M.M.,Schonemann M.D. et al., Mouse Numb is an essential gene involved in cortical neurogenesis, *Proc.Natl.Acad.SciUS*, 2000,97, 6844-49

Zigova T., Sanberg P.R.,The rising star of neural stem cell research, *Nature Biotechnol.*,1998, 16, 1007-9

Коллектив авторов:

1. Репин Вадим Сергеевич – член - корреспондент РАМН, профессор, д.м.н., заведующий лабораторией стволовой клетки человека РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН, директор медицинских программ ЗАО «РеМеТэкс»
2. Ржанинова Алла Анатольевна – к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории стволовой клетки человека РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН, директор экспериментальных программ ЗАО «РеМеТэкс»
3. Шаменков Дмитрий Алексеевич – ведущий научный сотрудник лаборатории стволовой клетки человека РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН, зам.генерального директора ЗАО «РеМеТэкс»