Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской Академии Наук

На правах рукописи

ПАЮШИНА Ольга Викторовна

МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ИЗ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ И ДЕФИНИТИВНЫХ ИСТОЧНИКОВ: ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук

> Научный консультант – доктор биологических наук, Домарацкая Елена Ивановна

Москва - 2015

оглавление

ВВЕДЕНИЕ7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ
1. История открытия, номенклатура и критерии МСК 18
1.1. История исследования МСК 18
1.2. Терминология 19
1.3. Методы выделения МСК 19
1.4. Минимальные критерии для идентификации МСК 20
2. Основные фенотипические и функциональные
характеристики МСК
2.1. Поверхностный фенотип и профиль экспрессии генов
2.2. Секреторный профиль
2.3. Адгезивные свойства
2.4. Рост <i>in vitro</i>
2.4.1. Характеристика роста при культивировании в стандартных условиях
2.4.2. Старение и самоподдержание
2.4.3. Влияние факторов роста и условий культивирования на МСК <i>in vitro</i>
2.5. Потенции к дифференцировке
2.5.1. Остеогенез
2.5.2. Адипогенез 32
2.5.3. Хондрогенез
2.5.4. Дифференцировка в другие мезенхимные и мезодермальные производные 35
2.5.5. Дифференцировка в экто- и энтодермальные производные
2.5.6. Возможные механизмы пластичности 40
3. Структура популяции стромальных клеток 42
3.1. Гетерогенность популяции МСК 42
3.2. Возможная организация стромального дифферона 45
3.2.1. Коммитированные стромальные предшественники 45
3.2.2. Предполагаемые мезенхимные стволовые клетки
3.2.3. Общие предшественники стромальных и кроветворных клеток
3.2.4. Плюрипотентные клетки
4. Локализация и функции МСК в организме 51
4.1. Локализация МСК 51
4.1.1. Источники МСК в развивающемся и зрелом организме
4.1.2. Микроокружение МСК 55
4.1.3. Миграция МСК 58
4.2. Роль МСК в регенерации 60
4.2.1. Дифференцировка МСК <i>in vivo</i> 60
4.2.2. Трофическая активность 61

4.3. МСК кроветворных органов как клетки,
организующие кроветворное микроокружение
4.3.1. Стромальная регуляция гемопоэза 64
4.3.1.1. Клеточный состав кроветворной стромы 64
4.3.1.2. Механизмы стромальной регуляции кроветворения
4.3.1.3. Роль МСК в поддержании кроветворения72
4.3.2. Характеристика МСК из дефинитивных и транзиторных органов гемопоэза 74
4.3.2.1. Костный мозг 74
4.3.2.2. Печень
4.3.2.3. Селезенка
5. Проблемы использования МСК в регенеративной медицине
5.1. Подходы к клиническому использованию МСК
5.1.1. Системное введение 79
5.1.2. Локальная доставка в место повреждения
5.1.3. Тканевая инженерия 81
5.1.4. Генная терапия
5.2. Область применения МСК 84
5.2.1. Заболевания опорно-двигательного аппарата
5.2.2. Сердечно-сосудистые заболевания
5.2.3. Неврология
5.2.4. Гематология и онкология
5.2.5. Иммуноконфликтные состояния и аутоиммунные заболевания
5.2.6. Другие заболевания
5.3. Проблемы и возможные риски применения МСК в клинике
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ
1. Экспериментальные животные 91
2. Культивирование клеток
2.1. Выделение клеток из тканей
2.2. Первичные и пассируемые культуры стромальных клеток
2.3. Анализ адгезивных свойств стромальных и миогенных предшественников 92
2.4. Обработка клеток 5-фторурацилом
2.5. Индукция дифференцировки МСК <i>in vitro</i>
2.6. Совместное культивирование различных клеточных популяций
2.7. Культивирование МСК на носителях
3. Эксперименты <i>in vivo</i>
3.1. Эктопическая трансплантация печени зародышей
3.2. Трансплантация клеток в диффузионных камерах
3.3. Трансплантация клеток на носителях

4. Анализ результатов
4.1. Морфологические исследования 96
4.2. Цитохимические исследования 96
4.3. Иммуноцитохимические исследования
4.4. Выявление никотиновых холинорецепторов с помощью α-бунгаротоксина
4.5. Молекулярно-генетический анализ 97
4.6. Количественный анализ и статистическая обработка результатов
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ 100
1. Характеристика клонального роста МСК в первичной культуре 100
1.1. Содержание клоногенных МСК в популяциях клеток кроветворных
органов крысы и мыши в пре- и постнатальном онтогенезе
1.2. Морфология и клеточный состав колоний, образуемых КОЕ-Ф 103
1.3. Сравнительная оценка остеогенных потенций КОЕ-Ф из кроветворных
органов в ходе онтогенеза на основании активности
щелочной фосфатазы в клетках колоний106
1.4. Антигенный фенотип клеток колоний: экспрессия маркеров МСК 110
2. Гетерогенность клеточного состава стромы зародышевой печени 114
2.1. Миофибробласты 115
2.1.1. Морфология миофибробластоподобных клеток и экспрессия ими десмина 115
2.1.2. Экспрессия специфических маркеров миофибробластов
различного происхождения 116
2.2. Колонии черепицеобразных клеток 118
2.2.1. Численность и морфология колоний, содержащих черепицеобразные клетки118
2.2.2. Экспрессия маркеров эпителиальных и эндотелиальных клеток
2.3. Скелетно-мышечные элементы 122
2.3.1. Морфология и фенотип спонтанно образующихся миотуб 122
2.3.2. Функциональные характеристики миотуб 124
2.3.3. Адгезивные свойства предшественников миотуб 126
2.3.3.1. Адгезия миогенных предшественников к белкам внеклеточного матрикса 126
2.3.3.2. Содержание миогенных предшественников
в субпопуляциях клеток, различающихся по срокам прикрепления к пластику 127
3. Характеристика МСК в монослое при последовательном
пассировании (субкультивировании) 128
3.1. Оценка пролиферативной активности пассируемых клеток
стромы кроветворных органов на основании экспрессии антигена Кі-67 129
3.2. Морфология и фенотип пассируемых стромальных клеток 130
3.2.1. Морфологические изменения клеток в ходе пассирования
3.2.2. Оценка содержания остеогенных клеток в пассируемых культурах
на основании активности щелочной фосфатазы132

3.2.3. Антигенный фенотип пассируемых клеток: экспрессия маркеров МСК 133
4. Дифференцировка МСК <i>in vitro</i> в индукционных средах 136
4.1. Остеогенез 136
4.1.1. Остеогенная дифференцировка в стандартной индукционной среде 136
4.1.1.1. Костный мозг 136
4.1.1.2. Печень зародышей 139
4.1.1.3. Селезенка
4.1.2. Остеогенная дифференцировка под влиянием факторов роста
4.1.2.1. Влияние bFGF и BMP-2 на дифференцировку МСК в остеогенной среде 144
4.1.2.2. Совместное культивирование МСК костного мозга
и зародышевой печени в остеогенной среде 146
4.2. Адипогенез 147
4.2.1. Адипогенная дифференцировка в стандартной индукционной среде 147
4.2.1.1. Костный мозг 147
4.2.1.2. Печень зародышей 148
4.2.1.3. Селезенка
4.2.2. Адипогенная дифференцировка, наблюдаемая при культивировании
МСК в среде без индукторов и в остеогенной среде 151
4.3. Хондрогенез 153
4.3.1. Костный мозг 154
4.3.2. Печень зародышей 155
4.3.3. Селезенка зародышей 157
4.4. Миогенез
4.4.1. Костный мозг
4.4.2. Печень зародышей
5. Сравнительный анализ субпопуляций МСК,
различающихся по чувствительности к 5-фторурацилу 162
5.1. Чувствительность КОЕ-Ф печени зародышей и костного мозга
половозрелых крыс к цитотоксическому действию 5-фторурацила 162
5.2. Остеогенные и адипогенные потенции субпопуляций МСК,
различающихся по чувствительности к 5-фторурацилу 164
6. Влияние компонентов внеклеточного матрикса
на клональный рост и дифференцировку МСК 169
6.1. Клональный рост МСК на компонентах внеклеточного матрикса 169
6.1.1. Содержание КОЕ-Ф в популяциях клеток костного мозга
и зародышевой печени, различающихся по скорости прикрепления
к фибронектину, коллагену I типа и ламинину 169
6.1.2. Эффективность клонирования МСК костного мозга при культивировании
на фрагментах фибронектина

6.2. Влияние адгезии к белкам внеклеточного матрикса на остеогенную
дифференцировку МСК костного мозга174
6.2.1. Остеогенная дифференцировка МСК при культивировании
на фибронектине, коллагене I типа и ламинине174
6.2.2. Остеогенная дифференцировка МСК на фрагментах фибронектина 176
6.3. Адипогенная дифференцировка МСК при культивировании на фибронектине,
коллагене I типа и ламинине 178
7. Экспериментальные подходы к изучению дифференцировки
MCK in vivo
7.1. Трансплантация МСК зародышевой печени в составе тканевых фрагментов 180
7.2. Трансплантация МСК в диффузионных камерах
7.2.1. Свежевыделенные клетки
7.2.2. Пассируемые МСК 185
7.3. Оценка пригодности различных материалов в качестве носителей для МСК186
7.3.1. Биоматериалы на основе костного матрикса 187
7.3.2. Коллаген-хитозановая матрица 189
7.3.3. Гемостатическая коллагеновая губка 191
7.3.4. Криогели 192
7.3.4.1. Коллагеновый криогель 193
7.3.4.2. Криогели на основе агарозы 195
7.3.4.3. Криогель из диметилакриламида с привитой желатиной 197
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 199
ВЫВОДЫ
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 209
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ
ПРИЛОЖЕНИЕ А. РИСУНКИ 301
ПРИЛОЖЕНИЕ Б. ТАБЛИЦЫ 319

введение

Актуальность проблемы. Мезенхимные стромальные клетки (МСК) представляют собой мультипотентные тканеспецифические стволовые и родоначальные клетки, способные к дифференцировке в различные типы клеточных элементов соединительной ткани, такие как остеобласты, хондробласты, адипоциты и стромальные клетки, организующие кроветворное микроокружение. МСК служат прекрасной моделью для исследования важнейших проблем клеточной биологии и биологии развития – таких как механизмы гистогенеза и регенерации тканей, пути регуляции клеточной пролиферации и дифференцировки. Начиная с 90-ых годов ХХ века в мировой науке отмечается повышенный интерес к МСК. В значительной мере это связано с возросшим осознанием роли стволовых клеток в формировании и поддержании стабильного функционирования тканей. Обнаружение в большинстве тканей организма клеток со свойствами стволовых, наличие которых ранее считалось характерной особенностью быстро обновляющихся клеточных популяций (кроветворной ткани, кишечного эпителия, эпидермиса т.п.), заставило пересмотреть сложившуюся концепцию стволовых клеток и по-новому взглянуть на их биологическую роль. На этой волне описанные в работах Фриденштейна колониеобразующие единицы фибробластов (КОЕ-Ф) стали рассматриваться как мезенхимные стволовые клетки, дающие начало различным тканям мезенхимного происхождения [Caplan, 1991], хотя впоследствии Международное общество клеточной терапии указало на несоответствие гетерогенной популяции МСК строгим критериям стволовости и предложило для них более осторожный термин «мультипотентные мезенхимные стромальные клетки» [Horwitz et al., 2005].

Еще одна причина усилившегося в последние десятилетия интереса к МСК связана с началом их использования в регенеративной медицине [Horwitz et al., 1999; Koç et al., 2000; Quarto et al., 2001; Шумаков и др., 2003]. МСК рассматриваются в качестве одного из наиболее перспективных ресурсов для бурно развивающихся в последнее время клеточной терапии и тканевой инженерии [Caplan, 2007]. Их преимущества связаны с относительной легкостью выделения и культивирования, со способностью к направленной миграции в поврежденные ткани и продукции широкого спектра биологически активных молекул, а также с присущими им иммуносупрессивными свойствами, позволяющими не только проводить аллогенную трансплантацию МСК, но и использовать их для лечения иммуноконфликтных состояний и аутоиммунных заболеваний [Владимирская, 2007; Татаринова и др., 2009]. Клиническое применение МСК потребовало не только совершенствования методов выделения и культивирования этих клеток, но и детального изучения механизмов, контролирующих их рост и дифференцировку.

В настоящее время в исследовании МСК достигнут значительный прогресс: охарактеризованы профиль экспрессии генов и спектр продуцируемых цитокинов, исследовано влияние условий культивирования на пролиферацию и дифференцировку *in vitro*, выявлены сигнальные пути, контролирующие основные направления дифференцировки, частично раскрыты механизмы направленной миграции в поврежденные ткани и участия в их регенерации [Bianco et al., 2001; Minguell et al., 2001; Baksh et al., 2004; Benayahu et al., 2007; Chamberlain et al., 2007; Phinney, Prockop, 2007; Salem, Thiemermann, 2010; Baglio et al., 2012]. Однако многие вопросы биологии МСК остаются неизученными. Мало известно о структуре дифферона стромальных клеток, о механизмах самоподдержания МСК и их коммитирования к дифференцировке, неоднозначны экспериментальные 0 возможности данные «неортодоксальной» дифференцировки МСК в производные других зародышевых листков, недостаточно изучена тканевая ниша МСК и влияние различных ее компонентов на те или иные аспекты жизнедеятельности этих клеток.

Клетки с характеристиками МСК обнаружены в большинстве тканей и органов как развивающегося, так и зрелого организма [in't Anker et al., 2003; da Silva Meirelles et al., 2006; Covas et al., 2008; Riekstina et al., 2009]. По-видимому, они локализуются в соединительной ткани, сопровождающей кровеносные сосуды и, согласно мнению ряда авторов, представляют собой специализированные перициты и/или адвентициальные клетки [da Silva Meirelles et al., 2006; Caplan, 2008; Corselli et al., 2010]. По имеющимся в литературе данным, МСК различной органной локализации в целом сходны между собой по морфологии, иммунофенотипическим характеристикам и широте потенциала к дифференцировке [Fukuchi et al., 2004; Panepucci et al., 2004; Sabatini et al., 2005; Kern et al., 2006; Liu et al., 2006; da Silva Meirelles et al., 2006; Hoogduijn et al., 2007], но в ряде случаев различаются экспрессией некоторых фенотипических маркеров или степенью выраженности тех или иных потенций [Wang et al., 2004 a; Bernardo et al., 2007; Riekstina et al., 2009; Sági et al., 2012; Signore et al., 2012; Vishnubalaji et al., 2012]. Гистогенетические взаимоотношения между популяциями МСК различной органной принадлежности остаются неясными: неизвестно, образуются ли эти клетки в различных тканях независимо или же происходят из общего источника, впоследствии расселяясь по организму и приобретая некоторые фенотипические и функциональные различия под влиянием микроокружения. Имеющиеся в литературе работы, посвященные сравнению свойств МСК различной локализации, не дают однозначного ответа на этот вопрос, важный для понимания того, как происходит становление дефинитивной популяции МСК в индивидуальном развитии.

С этой точки зрения особый интерес приобретает сравнительное исследование популяций МСК из кроветворных органов на разных стадиях онтогенеза. Несмотря на широкую распространенность МСК в организме, в органах гемопоэза они имеют исключительное

функциональное значение. Здесь они не только служат резервом для обновления соединительных тканей, но и играют первостепенную роль в организации кроветворного микроокружения - совокупности локальных условий, обеспечивающих самоподдержание и регулирующих дифференцировку стволовых кроветворных клеток (СКК). Будучи ключевым компонентом гетерогенной по клеточному составу стромы гемопоэтических органов, МСК участвуют в поддержании гемопоэза, привлекая кроветворные клетки за счет продукции хемоаттрактантов, регулируя их пролиферацию и дифференцировку путем контактных взаимодействий через поверхностные молекулы и секреции широкого спектра цитокинов [Haynesworth et al., 1996; Majumdar et al., 1998; 2000; Seshi et al., 2000; Wallace et al., 2001; Vacanti et al., 2005; Van Overstraeten-Schlögel et al., 2006;.Wagner et al., 2007; Li, Wu, 2011]. Кроме того, вклад МСК в создание кроветворного микроокружения состоит в их дифференцировке в более специализированные элементы стромы, способные поддерживать кроветворение эффективнее недифференцированных MCK [Majumdar et al., 1998].

развитии организма кроветворение B индивидуальном неоднократно меняет локализацию, последовательно перемещаясь из желточного мешка и аорто-гонадомезонефральной области в печень, селезенку и костный мозг. Существует гипотеза, что в ходе этого процесса происходит миграция МСК, подготавливающих «ложе» для приходящих вслед за ними кроветворных клеток. Прямых подтверждений этой гипотезы не существует, однако в ее пользу косвенно свидетельствуют такие данные, как наличие МСК в крови плодов [Campagnoli et al., 2001; Naruse et al., 2004; Mendes et al., 2005] при отсутствии или малочисленности их в периферической крови здорового половозрелого организма [Lazarus et al., 1997; Wexler et al., 2003; Koerner et al., 2006; Heino et al., 2012] и корреляция между содержанием СКК и клоногенных МСК (КОЕ-Ф) в печени, селезенке и костном мозге на разных стадиях онтогенеза мыши [Van Den Heuvel et al., 1987; Wolf et al., 1995]. Существование миграционного потока МСК, последовательно заселяющих кроветворные органы в процессе индивидуального развития, может означать гистогенетическое единство популяции этих клеток вне зависимости от стадии онтогенеза и анатомической локализации. В этом случае сравнительное исследование МСК из транзиторных и дефинитивных органов гемопоэза в различные периоды функциональной активности последних способно прояснить вопрос о том, как изменяются в ходе индивидуального малоизученный развития фенотипические и функциональные характеристики МСК и свойства организуемой ими кроветворной ниши.

Однако, несмотря на существование ряда работ, посвященных сравнению МСК из этих источников по отдельным характеристикам, систематических исследований подобного рода не проводилось. В противоположность детально и всесторонне охарактеризованным клеткам

зрелого костного мозга, который начиная с первых работ Фриденштейна и по настоящее время остается одним из наиболее употребительных источников МСК для экспериментального исследования и клинического применения, МСК из других органов эмбрионального и дефинитивного гемопоэза изучены относительно слабо. В частности, сведений об изменениях, претерпеваемых в ходе онтогенеза популяцией МСК зародышевой печени – основного органа кроветворения на протяжении значительной части пренатального развития – в литературе практически нет, за исключением сообщений о корреляции между содержанием КОЕ-Ф и активностью кроветворения в печени на разных стадиях онтогенеза мыши [Van Den Heuvel et al., 1987; Wolf et al., 1995]. Вопрос о том, как в ходе эмбриогенеза изменяются фенотипические и функциональные характеристики локализованных в этом органе МСК, в том числе их потенции к остео-, адипо- и хондрогенной дифференцировке, остается практически неизученным. Малочисленны также работы, посвященные свойствам МСК из селезенки [in't Anker et al., 2003; da Silva Meirelles et al., 2006; Hegyi et al., 2010], интересной тем, что в ходе развития организма миелоидное кроветворение в ней сменяется лимфоидным, а это, очевидно, требует изменений в организуемом МСК микроокружении. Скудны и данные о МСК, содержащихся в зачатке костного мозга в конце пренатального периода, до начала активного костномозгового кроветворения [Hu et el., 2002; Guillot et al., 2008; Zhang et al., 2009; Liu et al., 2011 b]. Наша работа призвана восполнить имеющиеся пробелы в знаниях о свойствах МСК костного мозга, печени и селезенки на стадиях развития организма, соответствующих неодинаковой активности кроветворения в этих органах.

В рамках проблемы формирования популяции МСК в индивидуальном развитии несомненный интерес представляет характеристика их микроокружения в различных кроветворных органах. Детальное изучение клеточного состава культур, полученных из соответствующих органов, может дать новую информацию о существующем в них микроокружении для кроветворных и иных стволовых/родоначальных клеток, в том числе для МСК. Для углубления знаний о тканевых нишах МСК, а также для совершенствования методов тканевой инженерии, важно и исследование взаимодействий МСК с компонентами внеклеточного матрикса. Являясь одними из основных компонентов микроокружения кроветворных органов, матриксные белки - прежде всего коллаген, фибронектин и ламинин - не только участвуют в контроле гемопоэза, обеспечивая адгезию кроветворных клеток и стимулируя их пролиферацию [Weinstein et al., 1989; Vuillet-Gaugler et al., 1990; Klein et al., 1995; Siler et al., 2000], но и связываются с поверхностными рецепторами на МСК [Gronthos et al., 2001 b; Docheva et al., 2007]. Однако имеющиеся в литературе данные о влиянии белков внеклеточного матрикса на прикрепление, рост и дифференцировку МСК неоднозначны [Hausman et al., 1996; Phinney et al., 1999 a; O'Connor et al., 2003; Hori et al., 2004; Salasznyk et

al., 2004; Klees et al., 2005; Hashimoto et al., 2006; Angstmann et al., 2011]. При этом большинство данных об адгезии и пролиферации МСК на матриксных белках получены на пассируемых культурах [Hori et al., 2004; Ogura et al., 2004; Salasznyk et al., 2004; Cool, Nurcombe, 2005; Hashimoto et al., 2006], тогда как исследования, посвященные влиянию этих белков на клональный рост КОЕ-Ф в первичной культуре, существенно отличный по своему характеру от роста пассируемых МСК, сравнительно малочисленны, а их результаты разноречивы [Phinney et al., 1999 a; Gronthos et al., 2001 b; Chen et al., 2007]. Кроме того, остается неизвестным, одинаковым ли образом отвечают на сигналы от внеклеточного матрикса стромальные предшественники из разных органов и меняется ли их способность к адгезивным взаимодействиям с его компонентами в ходе онтогенеза.

Еще одна малоисследованная проблема – установление структуры гистогенетического ряда МСК, представляющих собой гетерогенную популяцию. Одним из методических приемов для исследования иерархической организации клеточных популяций служит применение цитотоксических препаратов избирательного действия, поражающих клетки в зависимости от степени их зрелости или фазы клеточного цикла. К таким препаратам относится, в частности, 5фторурация (5-ФУ) - циклоспецифический агент, оказывающий цитотоксическое действие на протяжении всех стадий клеточного цикла. Механизм его влияния на клетки связан с инактивацией тимидилатсинтетазы, что ведет к недостатку тимидина, разрывам ДНК и гибели клетки при делении [Shohei, 1985]. Как было показано в экспериментах на кроветворных клетках, 5-ФУ удаляет из популяции быстро делящиеся коммитированные клетки, причем более зрелые из них обладают большей чувствительностью к нему [Yeager et al., 1983; Vetvicka et al., 1986; Rich, 1991; Домарацкая и др., 1995; Ivanovic et al., 1999], тогда как находящиеся в покое наиболее ранние стволовые клетки с повышенной способностью к самоподдержанию устойчивы к этому препарату [van Zant, 1984; Lerner, Harrison, 1990; Ivanovic et al., 1999]. Имеющиеся данные позволяют предполагать, что и в стромальном диффероне 5-ФУ селективно элиминирует более продвинутые в дифференцировке клетки, сохраняя наиболее примитивные предшественники [Minguell et al., 2000; Conget et al., 2001; Wang et al., 2006], однако его действие на стромальные клетки изучено в меньшей степени, чем на кроветворные, и нуждается в дополнительном исследовании.

Помимо вышесказанного, необходимо отметить, что к настоящему времени большинство данных о различных аспектах биологии МСК получены в экспериментах по их культивированию *in vitro*, тогда как особенности функционирования этой категории клеток в условиях *in vivo* слабо изучены. В связи с этим несомненную актуальность приобретают исследования, посвященные анализу поведения МСК, трансплантированных тем или иным способом в организм животного-реципиента. Для этой цели разработаны различные

экспериментальные модели, позволяющие оценивать способность стромальных клеток формировать дифференцированные ткани и организовывать кроветворное микроокружение *in vivo* – в частности, их трансплантация в составе тканевых фрагментов [Tavassoli, 1984; Schofield, 1986], в диффузионных камерах [Ashton et al. 1980; Bab et al., 1986; Friedenstein et al., 1987] и на искусственных подложках, служащих субстратом для образования очагов гемопоэза донорскими кроветворными клетками [Knospe et al., 1990]. Особое значение, в том числе прикладное, имеет разработка методов культивирования и трансплантации МСК на трехмерных носителях из натуральных или синтетических материалов [Dennis et al., 1992; Martin et al., 1997; Dong et al., 2001; Aung et al., 2002; Wang et al., 2006; Graziano et al., 2008], которые могут стать основой для создания тканеинженерных конструкций. Экспериментальные данные, которые могут быть получены с использованием всех этих моделей – в частности, сведения о взаимодействии трансплантированных МСК с организмом реципиента и о регуляции их дифференцировки тканевым микроокружением – необходимы не только для лучшего понимания биологии МСК, но и для эффективного и безопасного применения этих клеток в регенеративной медицине.

Таким образом, высокая актуальность исследования МСК с точки зрения фундаментальной науки и медицинской практики делает это направление одним из приоритетных в современной биологии.

Цели и задачи исследования. Основная **цель** работы состояла в выявлении органотипических особенностей популяций МСК как клеток, организующих кроветворное микроокружение, в различных органах транзиторного и дефинитивного гемопоэза, и анализе динамики изменения их характеристик в ходе индивидуального развития.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить содержание клеток с характеристиками МСК в строме костного мозга, печени и селезенки половозрелых животных и зародышей; проанализировать зависимость эффективности их клонирования, антигенного фенотипа, морфологии и клеточного состава образуемых ими колоний от органной принадлежности и стадии онтогенеза.

2. Проанализировать клеточный состав стромы зародышевой печени, дать фенотипическую характеристику различных типов клеток, содержащихся в ее культуре.

3. Охарактеризовать рост МСК из костного мозга, печени и селезенки развивающегося и зрелого организма при последовательном субкультивировании, проанализировав их пролиферативную активность, морфологические и фенотипические изменения по мере пассирования.

4. Провести сравнительный анализ потенций МСК из исследуемых источников к дифференцировке в различных направлениях.

5. Оценить влияние условий микроокружения на реализацию потенций МСК зрелого костного мозга и печени зародышей к дифференцировке *in vivo*.

6. Проанализировать чувствительность МСК костного мозга и зародышевой печени к цитотоксическому действию 5-ФУ и сравнить потенции субпопуляций МСК, различающихся по устойчивости к нему.

7. Исследовать влияние адгезивных взаимодействий МСК с различными компонентами внеклеточного матрикса на их клональный рост и дифференцировку *in vitro*.

Научная новизна исследования. Впервые проведено всестороннее комплексное сравнительное исследование популяций МСК, локализованных в костном мозге, печени и селезенке крысы на разных стадиях онтогенеза, включающее оценку эффективности клонирования, морфологии в первичной и пассируемой культуре, поверхностного фенотипа, пролиферативной активности, потенций к дифференцировке *in vitro* в остео-, адипо- и Показано, что, несмотря на морфологическое сходство хондрогенном направлениях. стромальных клеток из всех изученных органов и их способность к клональному росту, между ними существуют фенотипические различия в зависимости от органной принадлежности и стадии онтогенеза. Так, высокое содержание клеток с активностью щелочной фосфатазы (ЩФ), являющейся маркером ранних стадий остеогенеза, наблюдается только в колониях, образуемых КОЕ-Ф зрелого костного мозга, а присутствие существенного числа клеток, несущих характерный для МСК поверхностный антиген CD73 - в культурах костного мозга и зародышевой печени в период активного кроветворения в этих органах. Обнаружено, что МСК из пренатальных источников, включая кость с зачатком костного мозга, значительно уступают клеткам из костного мозга половозрелых животных по способности к остеогенезу, а стромальные клетки зрелой селезенки практически полностью лишены остеогенных потенций. Показана также слабая выраженность адипогенных потенций МСК из печени и селезенки на различных стадиях онтогенеза по сравнению с клетками из зрелого костного мозга.

Впервые проанализирована зависимость потенций МСК из печени крысы к остео- и адипогенезу *in vitro* и хондрогенезу в эктопических трансплантатах тканевых фрагментов от стадии пренатального развития и выявлена корреляция этих потенций с динамикой кроветворной активности печени.

Получены новые данные о потенциях субпопуляций МСК, устойчивых к цитотоксическому воздействию 5-ФУ, к пролиферации и дифференцировке. Показано, что стромальные клетки костного мозга или зародышевой печени, резистентные к 5-ФУ, имеют меньшую продолжительность активной пролиферации, чем чувствительные к нему, что может свидетельствовать о содержании среди них более зрелых клеток. В то же время выявлены определенные различия в характеристиках этой субпопуляции между костным мозгом половозрелых крыс и печенью зародышей. Так, для устойчивых к 5-ФУ МСК из костного мозга характерна более быстрая по сравнению с чувствительными к нему клетками потеря остеогенных потенций в ходе пассирования, тогда как соответствующая популяция МСК зародышевой печени, напротив, сохраняет эти потенции дольше, чем клетки, не обработанные 5-ФУ. Обнаруженные различия могут отражать неодинаковую структуру популяций стромальных клеток в сравниваемых органах, указывая на неодинаковое содержание в этих популяциях клеток различной степени зрелости.

В экспериментах по анализу влияния компонентов внеклеточного матрикса на дифференцировку МСК костного мозга впервые показано ингибирование остеогенеза при их культивировании на фибронектине и идентифицирован участок молекулы фибронектина, ответственный за этот эффект.

С использованием экспериментальной модели трансплантации клеток в перитонеальную полость животных-реципиентов в диффузионных камерах впервые оценены потенции МСК из печени зародышей крысы к дифференцировке *in vivo* в сравнении с таковыми стромальных клеток из зрелого костного мозга. Показано, что образование костной ткани клетками зародышевой печени происходит лишь в редких случаях при помещении в диффузионную камеру суспензии свежевыделенных клеток.

Впервые протестирована потенциальная пригодность ряда натуральных и синтетических материалов, включая биоматериалы на основе костного матрикса «Остеопласт-М» и «Остеопласт-Т», а также различные модификации криогелей на основе агарозы или диметилакриламида, к применению в качестве носителей для культивирования и трансплантации МСК.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты проведенной оценки относительного содержания МСК в различных кроветворных органах развивающегося и зрелого организма и сравнительного анализа фенотипических и функциональных особенностей этих клеток в зависимости от органной локализации и стадии развития дают представление об изменениях в популяции МСК, происходящих в ходе онтогенеза, и расширяют представления о закономерностях функционирования МСК как представителей когорты стволовых клеток в преи постнатальном развитии. На их основании выдвинута концепция созревания популяции МСК, происходящего в онтогенезе параллельно с созреванием стволовых кроветворных клеток (СКК) и приводящего к изменению качества кроветворного микроокружения.

Факты, выявленные в экспериментах по анализу роста и дифференцировки МСК на компонентах внеклеточного матрикса и в организме животного-реципиента после экспериментальной трансплантации, имеют существенное значение для понимания регуляторного влияния микроокружения на функционирование МСК и открывают перспективы

для исследования молекулярных механизмов этого влияния. Данные, полученные при анализе субпопуляций МСК с неодинаковой чувствительностью к 5-ФУ, могут быть учтены при построении гипотетической модели гистогенетического ряда стромальных клеток, о структуре которого в мировой литературе до сих пор не существует единого мнения. Особо следует подчеркнуть, что в связи с применением 5-ФУ в химиотерапии онкологических заболеваний исследование его влияния на строму кроветворных органов имеет не только теоретическое, но и практическое значение.

В перспективе результаты проведенных исследований, прежде всего анализа дифференцировки МСК в различных экспериментальных условиях *in vitro* и *in vivo*, могут иметь значение для подбора оптимального источника МСК с целью их использования в клеточной терапии, а также для разработки оптимальных протоколов культивирования этих клеток, в наибольшей мере способствующих сохранению их потенций. Сведения, полученные при оценке способности МСК прикрепляться, пролиферировать и дифференцироваться на тех или иных субстратах, а также совместимости различных натуральных и синтетических материалов с организмом реципиента, могут представлять ценность для разработки новых носителей с целью использования в тканевой инженерии.

Данные, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, могут найти применение в педагогическом процессе при чтении курсов лекций и написании учебных пособий по биологии развития и клеточной биологии.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Эффективность клонирования МСК из эмбриональных и дефинитивных органов гемопоэза, экспрессия ими поверхностных антигенов CD73 и CD90 и выраженность потенций к основным дифференцировкам коррелируют с кроветворной активностью органа, а пролиферативная активность клеток и степень накопления морфологических изменений в ходе пассирования – со стадией онтогенеза.

2. МСК костного мозга обладают большей способностью к адипогенезу, хондрогенезу и особенно к остеогенезу *in vitro* по сравнению с клетками из печени и селезенки. Более выраженные дифференцировочные потенции МСК костного мозга по сравнению с клетками зародышевой печени проявляются также *in vivo* при их трансплантации в диффузионных камерах.

3. Воздействие 5-ФУ на МСК костного мозга и зародышевой печени обогащает популяцию клетками со сниженным пролиферативным потенциалом. Резистентные к 5-ФУ МСК из двух источников различаются между собой по степени сохранения остеогенных потенций в ходе пассирования: в культуре костного мозга эта субпопуляция теряет способность

к остеогенезу быстрее, а в культуре зародышевой печени – медленнее, чем чувствительные к 5-ФУ клетки.

4. Фибронектин и коллаген I типа, а в случае клеток костного мозга также и ламинин, оказывают стимулирующее влияние на адгезию клоногенных МСК, обеспечивая их более раннее прикрепление к субстрату по сравнению с культуральным пластиком. При культивировании МСК костного мозга в индукционных средах коллаген I типа подавляет адипогенную дифференцировку, а фибронектин – остеогенную и адипогенную.

5. Полученные экспериментальные данные указывают на то, что в ходе индивидуального развития происходит функциональное созревание МСК, приводящее к изменению качества организуемого ими кроветворного микроокружения.

Апробация результатов. Материалы диссертации были представлены на следующих конференциях: І Съезде Общества клеточной биологии (Санкт-Петербург, 2003), отчетной конференции Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН «Биология стволовой клетки» (Москва, 2004), I Съезде физиологов СНГ (Сочи, Дагомыс, 2005), конференции «Биология стволовых клеток: фундаментальные аспекты» (Москва, 2005), симпозиуме с международным участием «Клеточные, молекулярные и эволюционные аспекты морфогенеза» (Москва, 2007), II Съезде Общества клеточной биологии (Санкт-Петербург, 2007), конференции «Современные проблемы биологии развития», посвященной 40-летию Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (Москва, 2007), симпозиуме «Культивируемые клетки как основа клеточных технологий» (Санкт-Петербург, 2009), VI международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность» (Москва, 2009), VII международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность» (Москва, 2010), I международной научно-практической конференции «Достижения, инновационные направления, перспективы развития и проблемы современной медицинской науки, генетики и биотехнологий» 2011), III (Екатеринбург, 31 марта конференции «Биология стволовых клеток: фундаментальные аспекты» (Москва, 2011), всероссийской научной конференции «Регенеративная биология и медицина» (Москва, 2011), II международной научнопрактической конференции «Достижения, инновационные направления, перспективы развития и проблемы современной медицинской науки, генетики и биотехнологий» (Екатеринбург, 15 декабря 2011), III Съезде Общества клеточной биологии (Санкт-Петербург, 2012), всероссийском симпозиуме «Биология клетки в культуре» (Санкт-Петербург, 2013). всероссийской конференции с международным участием «Биотехнология — от науки к практике» (Уфа, 2014), IV Съезде физиологов СНГ (Сочи, Дагомыс, 2014), 7-м ежегодном Всемирном конгрессе по регенеративной медицине и стволовым клеткам (Хайкоу, Китай, 2014).

Личное участие автора. Непосредственное участие автора заключалось в планировании и организации исследований, выборе используемых моделей, проведении экспериментов, анализе и интерпретации полученных результатов, формулировке научных положений и выводов, написании статей по результатам работы.

Публикации. По материалам диссертации опубликована 21 статья, в том числе 16 – в журналах, соответствующих Перечню ВАК.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. История открытия, номенклатура и критерии МСК

1.1. История исследования МСК

Еще в первой половине 20-го века российские гистологи Максимов и Заварзин выдвинули теорию мезенхимного резерва, по которой недифференцированные клетки эмбриональной мезенхимы сохраняются в половозрелом организме, служа источником пополнения фибробластов и других клеточных форм соединительных тканей [Заварзин, 1953]. Существование таких клеток в строме кроветворных органов впервые показал в 60-ых - 70-ых годах прошлого века А.Я. Фриденштейн. В его работах из костного мозга, тимуса и селезенки мыши и морской свинки были выделены клетки, способные к клональному росту в культуре с образованием колоний фибробластов - КОЕ-Ф [Фриденштейн и др., 1970; Кейлис-Борок и др., 1971; Friedenstein et al., 1976]. Эксперименты по культивированию стромальных клеток костного мозга in vitro и их обратной трансплантации в организм продемонстрировали их высокий пролиферативный потенциал и способность к дифференцировке в кость, хрящ и кроветворную строму. При этом, по крайней мере, некоторые клоны стромальных предшественников сохраняли множественные потенции к дифференцировке после длительного размножения in vitro, что позволяло считать их вероятными кандидатами на роль стромальных стволовых клеток [Friedenstein et al., 1982; 1987; Owen, Friedenstein, 1988].

В 90-ых годах родоначальные клетки стромы костного мозга были переоткрыты зарубежными исследователями, в первую очередь Арнольдом Капланом, предложившим концепцию мезенхимной стволовой клетки как общего предшественника клеточных элементов некроветворных тканей мезенхимного происхождения [Caplan, 1991]. С тех пор появилось множество работ, посвященных изучению МСК, прежде всего с точки зрения их потенций к дифференцировке. Были детально охарактеризованы фенотипические характеристики клеток со свойствами МСК, выделенных из многих тканей, проанализированы особенности их роста в культуре, разработаны условия индукции дифференцировки в различных направлениях, оценено влияние различных факторов на пролиферацию и дифференцировку [Bianco et al., 2001; Minguell et al., 2001; Baksh et al., 2004]. Эти исследования, проводимые в основном на культурах клеток *in vitro*, привели к значительному прогрессу в понимании биологии МСК, однако многие ее аспекты, прежде всего связанные с поведением этих клеток в их естественном окружении *in vivo*, остались недостаточно изученными. В последние годы больше внимания

стало уделяться таким вопросам, как характеристика ниши МСК в различных тканях, анализ их фенотипа *in situ*, исследование миграции и регуляторных взаимодействий с другими клетками организма [Jones, McGonagle, 2008; Kuhn, Tuan, 2009; Augello et al., 2010; Ohishi, Schipani, 2010]. При этом наметилась тенденция рассматривать МСК не столько как предшественники зрелых клеток соединительных тканей, сколько как клетки, создающие микроокружение для тканеспецифических стволовых клеток и оказывающие регуляторное влияние на ткань благодаря продукции биоактивных молекул [Caplan, 2009; Linder et al., 2010; Oh, 2010]. Однако остается еще много неясных вопросов, касающихся как фундаментальных аспектов жизнедеятельности МСК, так и возможностей их использования в клеточной терапии, так что история исследования этих клеток далека от завершения.

1.2. Терминология

Благодаря работам Каплана [Caplan, 1991], обозначившим адгезивные к пластику фибробластоподобные клетки с множественными потенциями к дифференцировке в мезенхимные производные как мезенхимные стволовые клетки, этот термин получил широкое распространение, хотя ряд авторов использовали для тех же клеток и другие названия – в частности, стромальные стволовые клетки [Bianco et al., 2001] или мезенхимные родоначальные 2000]. Во многих работах эти термины относились к клетки [Minguell et al., нефракционированным клеточным популяциям, включающим не только истинно стволовые клетки, но и клетки с ограниченными потенциями к дифференцировке, не являющиеся стволовыми в строгом смысле слова. В частности, способность к самоподдержанию, являющаяся одним из обязательных требований к стволовым клеткам, по-видимому, свойственна лишь минорной субпопуляции стромальных клеток, которую пока не удается надежно идентифицировать. Для прояснения терминологии и устранения несоответствия между номенклатурой и биологическими характеристиками Международное общество клеточной терапии рекомендовало обозначать популяции фибробластоподобных клеток с потенциями к дифференцировке в нескольких направлениях термином «мультипотентные мезенхимные стромальные клетки», сохранив термин «мезенхимные стволовые клетки» лишь за теми из них, которые удовлетворяют строгим критериям стволовости [Horwitz et al., 2005].

1.3. Методы выделения МСК

Способность стромальных предшественников прикрепляться к поверхности пластиковых культуральных сосудов лежала в основе исторически первого метода их

выделения, разработанного Фриденштейном [Фриденштейн и др., 1970; Friedenstein et al., 1976, 1982, 1987]. Этот метод предполагает помещение суспензии клеток, полученной из костного мозга или других тканей путем механической диссоциации или ферментативной обработки, в пластиковые флаконы на срок от нескольких часов до нескольких суток. За это время большинство КОЕ-Ф прикрепляются к дну флакона, тогда как кроветворные и другие клетки остаются в суспензии и удаляются при последующей смене среды.

Отбор клеток по адгезивности к пластику является обязательной стадией подавляющего большинства применяемых в настоящее время протоколов выделения МСК, однако получаемая таким образом популяция характеризуется значительной гетерогенностью по морфологии и степени зрелости клеток. Образуемые ими колонии имеют неодинаковые размеры ввиду разной скорости пролиферации, различаются по цитохимическим свойствам (в частности, по активности ШФ) и по потенциям составляющих их клеток к дифференцировке *in vitro* и *in vivo* [Owen et al., 1987; Owen, 1988; Phinney et al., 1999 b]. В попытках получить более гомогенную популяцию МСК и устранить контаминацию кроветворными клетками многие исследователи предваряют селекцию адгезивных клеток центрифугированием клеточной суспензии в градиенте плотности фиколла или перколла, отбирая фракцию мононуклеарных клеток с низкой плотностью [Colter et al., 2000; Sekiya et al., 2002 a; Lange et al., 2005 b] либо сортировкой клеток по размеру [Ghilzon et al., 1999; Hung et al., 2002] или экспрессии поверхностных маркеров – в частности, Stro-1 [Gronthos et al., 1994], CD271 [Quirici et al., 2002], CD105 [Aslan et al., 2006], CD106 в сочетании со Stro-1 [Gronthos et al., 2003], стадиеспецифического эмбрионального антигена-1 (SSEA-1) [Anjos-Afonso, Bonnet, 2007]. Однако использование этих методик не позволяет полностью устранить гетерогенность популяции МСК, а разнообразие протоколов их изоляции, применяемых разными лабораториями, затрудняет сравнение получаемых данных [Wagner, Ho, 2007].

1.4. Минимальные критерии для идентификации МСК

Отсутствие единого общепринятого метода выделения МСК из тканей привело к потребности в разработке критериев для стандартизации получаемых популяций. С этой целью Комитет по мезенхимным и тканевым стволовым клеткам Международного общества клеточной терапии в 2006 г. предложил следующий минимальный набор условий для отнесения клеток человека к мультипотентным мезенхимным стромальным [Dominici et al., 2006]:

1) Адгезия к пластику при культивировании в стандартных условиях. Несмотря на отмечаемые рядом авторов различия в выраженности адгезивных свойств различных популяций MCK [Yamada et al., 2000; Wan et al., 2006; Буеверова и др., 2008], прикрепление к

пластику свойственно всем клеткам этого типа и является необходимым условием их размножения *in vitro*. Хотя некоторые авторы сообщают о возможности поддержания и размножения MCK в суспензионной культуре [Baksh et al., 2003], соответствующие протоколы требуют специфических условий культивирования, и, очевидно, при переносе клеток в стандартную культуру можно ожидать их прикрепления к поверхности пластика.

2) Экспрессия специфических поверхностных антигенов. В качестве положительных маркеров МСК предложены поверхностные антигены CD73 (экто-5'-нуклеотидаза, исходно выявленная как антиген, распознаваемый моноклональными антителами SH3 и SH4), CD90 (Thy-1, член суперсемейства иммуноглобулинов) и CD105 (рецептор трансформирующего фактора роста-β (TGF-β), известный также как антиген SH2 или эндоглин). В связи с недостаточной специфичностью каждого из этих маркеров (CD73 присутствует также в лимфоидной ткани, CD90 – на поверхности ранних кроветворных клеток, T-лимфоцитов, гранулоцитов, фибробластов, нейронов и эпителиальных клеток, CD105 – на макрофагах, фибробластах, эндотелии и синцитиотрофобласте) для отнесения исследуемой популяции к МСК требуется одновременное присутствие всех трех молекул. При оценке методом проточной цитометрии их должны нести не менее 95% клеток.

Кроме того, для идентификации МСК необходимо исключить наличие примеси кроветворных клеток, убедившись в отсутствии панлейкоцитарного антигена CD45, маркера кроветворных родоначальных клеток и эндотелия CD34, одного из маркеров клеток моноцитарного ряда - CD14 или CD11b, маркера В-лимфоцитов CD79α или CD19, а также антигена гистосовместимости HLA-DR (присутствие последнего на МСК допускается только после стимуляции интерфероном-γ). Содержание в популяции клеток, несущих кроветворные маркеры, не должно превышать 2%.

3) Мультипотентность. При культивировании в соответствующих условиях МСК должны проявлять потенции к дифференцировке в остеобласты, адипоциты и хондробласты. Эти направления дифференцировки вляются наиболее изученными, для каждого из них подобраны стандартные составы индукционных сред, а также цитохимические, иммуноцитохимические и молекулярно-генетические маркеры, позволяющие выявлять различные стадии соответствующей дифференцировки.

Для отнесения клеточной популяции к категории МСК она должна удовлетворять одновременно всем вышеперечисленным условиям. Впрочем, рекомендованные критерии не окончательны и по мере получения новых знаний могут уточняться и модифицироваться. Кроме того, при исследовании МСК, полученных от лабораторных животных, следует иметь в виду, что их иммунофенотип может отличаться от рекомендованного для клеток человека. В

частности, антиген CD34, отсутствующий на МСК человека, может присутствовать на соответствующих клетках из костного мозга мыши [Charbord et al., 2002; Peister et al., 2004].

2. Основные фенотипические и функциональные характеристики МСК

2.1. Поверхностный фенотип и профиль экспрессии генов

Поверхностный фенотип МСК не исчерпывается набором антигенов, рекомендованных Международным обществом клеточной терапии для идентификации этих клеток. На поверхности МСК человека и лабораторных животных присутствует и множество других молекул, которые могут быть использованы в качестве антигенных маркеров. Многие из них опосредуют адгезивные взаимодействия МСК с окружающими клетками и компонентами внеклеточного матрикса. Это, в частности, CD49e, представляющий собой субъединицу интегрина α 5 [Gronthos et al., 2001 a; Zhou et al., 2005], CD29 и CD51 – субъединицы интегринов соответственно β 1 и α V [Hung et al., 2002], рецептор гиалуроновой кислоты CD44 [Gronthos et al., 2001 a; Hung et al., 2002; De Ugarte et al., 2003; Xu et al., 2004; Осипова и др., 2009; Halfon et al., 2011] и ряд молекул клеточной адгезии - CD54 (молекула межклеточной адгезии-1, ICAM-1), CD166 (молекула адгезии активированных лейкоцитов, ALCAM) [Zhou et al., 2005; Oсипова и др., 2005; Halfon et al., 2001 a; 2001 a; 2003; Halfon et al., 2011], CD146 [Gronthos et al., 2001 a; 2003; Halfon et al., 2011], CD146 [Gronthos et al., 2001 a; 2003; Halfon et al., 2011], CD146 [Gronthos et al., 2001 a; 2003; Halfon et al., 2011], CD146 [Gronthos et al., 2001 a; 2003; Halfon et al., 2011].

Другая группа поверхностных антигенов МСК – рецепторы цитокинов и факторов роста. Как было упомянуто выше, один из основных маркеров МСК CD105 является рецептором TGFβ. На поверхности МСК обнаружен также рецептор трансферрина CD71 [Xu et al., 2004]. По некоторым данным, они экспрессируют рецептор фактора стволовых клеток (SCF) CD117, известный также как c-kit, причем на наиболее примитивных самоподдерживающихся клетках его уровень выше, чем на более зрелых [Zhou et al., 2005]. Впрочем, другие авторы отмечают отсутствие на МСК этого антигена [Lin et al., 2003]. В последнее время особое внимание исследователей привлекает CD271 - низкоаффинный рецептор фактора роста нервов (NGF), селекция по которому позволяет получить достаточно гомогенную популяцию мультипотентных МСК [Quirici et al., 2002; Tormin et al., 2011]. Особая ценность этого маркера для проспективного выделения МСК состоит в его отсутствии на остальных типах клеток костного мозга, за исключением эритроидных [Boxall, Jones, 2012].

Среди других поверхностных маркеров МСК следует упомянуть CD13, участвующий в метаболизме биологически активных пептидов, в контроле роста и дифференцировки, в

фагоцитозе [Lin et al., 2003; De Ugarte et al., 2003; Xu et al., 2004; Осипова и др., 2009], регуляторный белок системы комплемента CD59 [Lin et al., 2003], белок суперсемейства иммуноглобулинов CD200 [Delorme et al., 2008], а также антиген с неизвестной функцией Stro-1, широко применяемый для выделения клоногенных MCK из костного мозга человека [Gronthos et al., 1994; 2003; De Ugarte et al., 2003].

Следует отметить, что ни один из известных поверхностных антигенов или даже комбинация нескольких из них не может служить универсальным маркером МСК ввиду недостаточной специфичности. Иммунофенотип МСК представляет собой сочетание маркеров, присущих различным типам клеток. При этом существуют субпопуляции стромальных клеток, обладающие всеми свойствами МСК, но лишенные таких их маркеров, как, например, Stro-1 [Hung et al., 2002] или CD146 [Tormin et al., 2011]. Характеристика антигенного профиля МСК затрудняется и тем обстоятельством, что набор экспрессируемых молекул неодинаков у разных клонов, не отражает потенций клеток к дифференцировке, зависит от их видовой и органной принадлежности и существенно изменяется в процессе культивирования [Bianco et al., 2001; Boxall, Jones, 2012]. В частности, длительное пассирование МСК из костного мозга человека, приводящее к старению культуры, сопровождается потерей CD106, CD271 и Stro-1, что дает основания предполагать связь этих антигенов с положением МСК в гистогенетическом ряду и рассматривать их в качестве вероятных маркеров наиболее молодых и потентных клеток [Boxall, Jones, 2012]. В то же время экспрессия других маркеров, например, CD9, в ходе пассирования, напротив, усиливается [Halfon et al., 2011].

Анализ профиля экспрессии генов показал одновременное присутствие в МСК транскриптов, характерных для хондроцитов, миобластов, остеобластов, адипоцитов и кроветворной стромы (что отражает потенции этих клеток к дифференцировке), а также эндотелия, эпителия и клеток нервной ткани [Seshi et al., 2000; Tremain et al., 2001; Delorme et al., 2006]. Дифференцировка МСК в том или ином направлении сопровождается соответствующим изменением их фенотипических характеристик, однако при этом клетки могут стохастически экспрессировать также и маркеры других линий дифференцировки. Стохастическая репрессия/индукция генов, кодирующих эти маркеры, может лежать в основе фенотипической пластичности мезенхимных клеток, делая возможным их переход с одного пути дифференцировки на другой [Dennis, Charbord, 2002].

Транскриптом МСК неодинаков у клеток из разных источников [Panepucci et al., 2004, Götherström et al., 2005; Nakanishi et al., 2011; Sági et al., 2012] и зависит от условий культивирования [Wagner et al., 2006]. При этом, как и в случае поверхностных антигенов, экспрессия ни одного отдельно взятого гена не является строго специфичной для МСК и, следовательно, не может служить маркером для их идентификации.

2.2. Секреторный профиль

Функции МСК как клеток, поддерживающих гемопоэз и способствующих репарации поврежденных тканей, в значительной мере определяются секрецией ими широкого спектра регуляторных молекул. МСК конститутивно выделяют в среду множество цитокинов и факторов роста, включая интерлейкин (ИЛ)-1β, ИЛ-6, ИЛ-11, колониестимулирующие факторы для гранулоцитов (Г-КСФ), макрофагов (М-КСФ), гранулоцитов и макрофагов (ГМ-КСФ), тромбопоэтин, Flt-3-лиганд, SCF, фактор некроза опухолей α (TNF α), лейкозингибирующий фактор (LIF), фактор роста гепатоцитов (HGF), фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF), TGF-β, лептин, адреномедулин, ангиопоэтин-1 [Haynesworth et al., 1996; Guerriero et al., 1997; Wallace et al., 2001; Kinnard et al., 2004; Corre et al., 2006; Nakagami et al., 2006; Van Overstraeten-Schlögel et al., 2006; Nakanishi et al., 2011; Chang et al., 2013 a]. На уровне мРНК показана также экспрессия ими ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-12, ИЛ-14, ИЛ-15, ИЛ-27, инсулиноподобного фактора роста (IGF), эпидермального фактора роста (EGF) [Majumdar et al., 1998; Silva et al., 2003; Zhu et al., 2003; Asumda, Chase, 2011]. Среди молекул, секретируемых МСК и опосредующих их регуляторное влияние на окружающие клетки, следует упомянуть также хемоаттрактанты для кроветворных клеток – фактор стромального происхождения-1 (SDF-1, также известный как хемокин CXCL12) и хемоаттрактантный белок для моноцитов-1 (MCP-1) [Kinnard et al., 2004; Van Overstraeten-Schlögel et al., 2006] – и различные компоненты внеклеточного матрикса, такие как коллаген I и III типов, ламинин, виментин, остеонектин [Hu et al., 2003; Silva et al., 2003; Klees et al., 2005].

Секреторный профиль МСК может изменяться под влиянием различных гуморальных регуляторов и факторов микроокружения. В частности, показаны стимулирующее действие ИЛ-1α на продукцию стромальными клетками ИЛ-6, ИЛ-11, LIF, Г-КСФ, М-КСФ и ГМ-КСФ [Haynesworth et al., 1996; Majumdar et al., 2000б] и гидрокортизона – на продукцию Г-КСФ [Zhu et al., 2003], зависимость уровня экспрессии цитокинов (в частности, ИЛ-8) от механических свойств субстрата, используемого для культивирования МСК [Seib et al., 2009], и усиленная секреция ими HGF и VEGF в условиях гипоксии [Chang et al., 2013 a].

2.3. Адгезивные свойства

Механизм адгезии МСК к культуральному пластику не вполне ясен. Вероятно, первоначальное прикрепление поверхности (полистирола, клеток к пластика поливинилкарбоната и т.п.) осуществляется за счет неспецифических электростатических и гидрофобных взаимодействий. Показано, обработка что пластика окислителями,

высоковольтным разрядом или ультрафиолетовым излучением, обеспечивающая образование на его поверхности отрицательного заряда, усиливает адгезию клеток, а блокирование гидроксильных и карбоксильных групп ослабляет ее [Amstein, Hartman, 1975; Curtis et al., 1983; Ramsey et al., 1984]. На следующем этапе адгезии неспецифические взаимодействия клеток с пластиком сменяются связыванием мембранных рецепторов с белками, адсорбирующимися на поверхность субстрата из сыворотки или выделяемыми самими клетками – в частности, фибронектином, ламинином, витронектином, коллагеном нескольких типов. Эти белки содержат так называемую RGD-последовательность (аргинин – глицин – аспарагиновая кислота), распознаваемую интегринами – мембранными молекулами, представляющими собой гетеродимеры из двух полипептидных цепей - α и β. МСК экспрессируют несколько типов α- и β-субъединиц интегринов (α 1, α 2, α 3, α 4, α 5, α 6, α v, β 1, β 3 и β 4), комбинации которых образуют различные рецепторы, способные связывать один или несколько матриксных белков [Majumdar et al., 2003; Gronthos et al., 2001 b; Docheva et al., 2007]. Взаимодействие MCK с матриксом через интегрины сопровождается образованием фокальных контактов и перестройкой актинового цитоскелета, что приводит к распластыванию клеток на субстрате и изменению активности генов, в том числе контролирующих пролиферацию и дифференцировку [Docheva et al., 2007].

МСК обладают неодинаковой способностью прикрепляться к различным субстратам. Так, коллаген I типа и фибронектин обеспечивают их адгезию эффективнее, чем коллаген IV типа, витронектин и ламинин-1 [Salasznyk et al., 2004, Ogura et al., 2004]. По другим данным, лучшим субстратом для прикрепления КОЕ-Ф является пластик, затем следуют поли-D-лизин, фибронектин, коллаген I типа, коллаген IV типа и ламинин [Phinney et al., 1999 a]. Адгезивные взаимодействия с компонентами внеклеточного матрикса могут влиять на различные аспекты функционирования МСК. Так, эксперименты по культивированию МСК костного мозга человека в бессывороточной среде показали, что взаимодействие клеток с коллагеном нескольких типов, фибронектином и ламинином через интегрины β1 и с витронектином через интегрин $\alpha\nu\beta3$ способно обеспечивать формирование клональных колоний [Gronthos et al., 2001] b]. Кроме того, показана стимуляция пролиферации МСК коллагеном I или IV типа [Hori et al., 2004] и ламинином [Hashimoto et al., 2006] и их усиленная миграция под влиянием фибронектина [Rüster et al., 2005]. Есть данные о влиянии белков внеклеточного матрикса и на дифференцировку МСК в различных направлениях. В частности, адгезия клеток к коллагену II типа усиливает остеогенез и подавляет адипогенез в соответствующих индукционных средах [Chiu et al., 2012], покрытие поверхности коллагеном IV типа также благоприятствует остеогенезу [Angstmann et al., 2011], а при культивировании на коллагене I типа, витронектине или ламинине-5 костная дифференцировка МСК возможна даже в отсутствие индукторов [Salasznyk et al., 2004; Klees et al., 2005]. Стимуляция их жировой дифференцировки

наблюдается под влиянием адгезии к ламинину [Hausman et al., 1996] и, по сообщениям некоторых авторов, к фибронектину [Angstmann et al., 2011], хотя данные о влиянии последнего на адипогенез противоречивы [Hausman et al., 1996; O'Connor et al., 2003; Luo et al., 2008].

2.4. Poct in vitro

2.4.1. Характеристика роста при культивировании в стандартных условиях

При культивировании в стандартной среде без индукторов дифференцировки МСК формируют слой фибробластоподобных клеток, форма которых варьирует от веретеновидной или звездчатой до широкой и уплощенной, что может отражать гетерогенность популяции по степени зрелости и потенциям [Sekiva et al., 2002 a; Tropel et al., 2004]. По мере пассирования МСК степень их морфологической гетерогенности снижается [Prockop et al., 2001; Анохина, Буравкова, 2007]. Скорость роста культуры, определяемая, как правило, по времени удвоения популяции, зависит от видовой и органной принадлежности клеток, возраста донора, числа пройденных пассажей и других факторов. По некоторым оценкам, для МСК из костного мозга человека время удвоения популяции составляет в среднем 30–33 ч [Conget, Minguell, 1999; Guo et al., 2001]. Близко к этим значениям время удвоения популяции MCK крысы [Bellows et al., 2003; Zhang et al., 2005 a]; впрочем, некоторые авторы отмечают более быстрый их рост по сравнению с МСК человека [Javason et al., 2001]. У мыши скорость роста МСК значительно варьирует между разными линиями [Peister et al., 2004], как и у человека – между разными донорами [Colter et al., 2000]. Некоторые авторы отмечают обратную зависимость скорости пролиферации МСК от плотности посева [Colter et al., 2000; Javason et al., 2001; Peister et al., 2004], хотя другие не находят такой связи [Анохина, Буравкова, 2007] или сообщают о наиболее быстром росте клеток, посеянных со средней плотностью [Neuhuber et al., 2008]. Кинетика роста МСК характеризуется отсутствием пролиферации в первые дни после посева (лаг-фаза) с последующим наступлением фазы быстрого экспоненциального роста, после чего культура входит в стационарную фазу, значительно снижая скорость пролиферации. Длительная (3-5 сут) лаг-фаза наблюдается при малом содержании клоногенных клеток, а именно в первичной культуре костного мозга [Vidal et al., 2006] или в пассируемых культурах с крайне низкой плотностью посева [Prockop et al., 2003]. В последнем случае показано, что вступление клеток в фазу экспоненциального роста требует накопления в среде выделяемого ими Dickkopf-1 - ингибитора канонического сигнального пути Wnt [Prockop et al., 2003].

В культурах МСК в активную пролиферацию (фазы клеточного цикла S, G2 и M) бывает вовлечена лишь малая доля клеток – от 3,55% до 20% в зависимости от происхождения клеток

и условий культивирования. Остальные клетки находятся в G0/G1 периоде, причем среди них присутствует вариабельная по размеру минорная субпопуляция с содержанием РНК и ДНК, типичным для покоящихся клеток [Conget, Minguell, 1999; Minguell et al., 2000; Hu et al., 2003; Zhou et al., 2005]. Возможно, эта субпопуляция содержит наиболее ранние некоммитированные клетки, являющиеся кандидатами на роль *bona fide* мезенхимных стволовых клеток.

2.4.2. Старение и самоподдержание

Вопрос о способности МСК к самоподдержанию окончательно не решен. Особенности биологии этих клеток не позволяют получить строгие доказательства их самоподдержания in vivo, аналогичные имеющимся для СКК [Linder et al., 2010]. При культивировании МСК in vitro многими авторами отмечены признаки репликативного старения – изменение морфологии [Liu et al., 2003; Bonab et al., 2006; Neuhuber et al., 2008], замедление пролиферации [Bruder et al., 1997; Banfi et al., 2000; Liu et al., 2003; Осипова и др., 2009], потеря клоногенной способности [DiGirolamo et al., 1999], снижение адгезивности к пластику и уровня экспрессии цитокинов [Vacanti et al., 2005]. Данные о влиянии длительного культивирования на потенции МСК к дифференцировке противоречивы. Вероятно, степень их сохранения в ходе пассирования неодинакова у разных клеток гетерогенной популяции МСК, зависит от источника клеток и подвержена влиянию условий культивирования. Так, одни авторы отмечают снижение потенций МСК в ходе пассирования [Banfi et al., 2000; Kang et al., 2004; Chen et al., 2005] или преимущественное сохранение ими способности к остеогенезу [DiGirolamo et al., 1999; Bonab et al., 2006; Neuhuber et al., 2008], тогда как другие сообщают о длительном сохранении пассируемыми клетками мультипотентности [De Bari et al., 2001; Zhou et al., 2003; Seruya et al., 2004; Lange et al., 2005 b]. Неодинаков и пролиферативный потенциал различных популяций МСК - по разным данным, они могут пройти в культуре от 5-8 до 50 и более пассажей в зависимости от источника клеток и условий культивирования [Bruder et al., 1997; Lin et al., 2003; Meirelles, Nardi, 2003; Tropel et al., 2004; Vacanti et al., 2005; Kern et al., 2006; Koerner et al., 2006; Анохина, Буравкова, 2007].

Репликативное старение МСК обусловлено укорочением теломер при делении [Banfi et al., 2002; Bianchi et al., 2003; Baxter et al., 2004; Bonab et al., 2006]. Это связано с тем, что теломеразная активность, исходно присутствующая в МСК, в ходе культивирования снижается или полностью теряется [Pittenger et al., 1999; Banfi et al., 2002; Izadpanah et al., 2005]. Низкая активность теломеразы особенно характерна для МСК от старых доноров [Asumda, Chase, 2011], тогда как в клетках плодов она выше, чем в МСК зрелого костного мозга [Guillot et al., 2007]. В то же время среди МСК половозрелого организма обнаружены клетки с высокой

теломеразной активностью, способные длительно пролиферировать с сохранением множественных потенций к дифференцировке [Gronthos et al., 2003; Seruya et al., 2004], что может говорить о существовании минорной субпопуляции самоподдерживающихся МСК. Выдвигаются также предположения, что индукция теломеразы в МСК происходит лишь в случае потребности в усиленной пролиферации, или же способность этих клеток к длительному росту *in vitro* связана с альтернативными механизмами удлинения теломер, не требующими теломеразы и основанными на репликации или рекомбинации [Serakinci et al., 2008].

В качестве косвенного свидетельства способности, по крайней мере, части популяции МСК к самоподдержанию можно рассматривать и экспрессию генов, активность которых характерна для эмбриональных стволовых клеток и считается маркером стволовости – в частности, Oct-4, Sox-2, Rex-1 [Kolf et al., 2007]. МСК, экспрессирующие эти гены, обнаружены в различных зародышевых тканях [Fukuchi et al., 2004; Guillot et al., 2007; Wang et al., 2008; Wenceslau et al., 2011] и в зрелом костном мозге [Izadpanah et al., 2005; Zhang et al., 2005 a; Asumda, Chase, 2011] хотя имеются также сообщения об отсутствии данных маркеров в МСК зародыша [Lai et al., 2010 a] и половозрелого организма [Guillot et al., 2007; Pierantozzi et al., 2011]. Показано, что отбор субпопуляции наиболее ранних родоначальных клеток, усиленно экспрессирующих Oct-4 и другие эмбриональные маркеры, происходит при длительной инкубации МСК из костного мозга в среде без сыворотки и факторов роста; при последующем переносе в стандартную среду эти клетки активно размножаются, демонстрируя повышенную способность к клональному росту, более длинные теломеры и сохраненные потенции к остео- и адипогенезу [Pochampally et al., 2004]. На существование фракции МСК с повышенным пролиферативным потенциалом может указывать и отмечаемая в ряде работ кинетика роста стромальных клеток костного мозга при длительном культивировании: замедление и практически полная остановка пролиферации после первых 4-5 пассажей в дальнейшем сменяются ее возобновлением, что может быть результатом вычленения субпопуляции МСК, не подверженной репликативному старению [Zhang et al., 2005 a; Анохина, Буравкова, 2007].

По некоторым данным, самоподдержание МСК может регулироваться такими факторами, как LIF, bFGF и Wnt [Kolf et al., 2007]. Предполагается, что в этой регуляции могут быть задействованы сигнальные пути Jak/STAT, TGF-β и Notch [Benayahu et al., 2007].

2.4.3. Влияние факторов роста и условий культивирования на МСК in vitro

На пролиферацию и другие аспекты жизнедеятельности МСК в культуре влияет присутствие в среде различных гуморальных регуляторов [Молчанова и др., 2008]. В частности, показана стимуляция роста МСК под действием EGF [Owen et al., 1987; Gronthos,

Simmons, 1995; Татата et al., 2006], фактора роста из тромбоцитов (PDGF) [Gronthos, Simmons, 1995; Gruber et al., 2004], bFGF [Hanada et al., 1997; Tsutsumi et al., 2001; Hori et al., 2004; Hankemeier et al., 2005; Solchaga et al., 2005; Guillot et al., 2007], IGF-1 [Gronthos, Simmons, 1995; Guo et al., 2001], интерферона γ , TNF- α , SCF [Guo et al., 2001], ИЛ-3 [Yamada et al., 2000; Li et al., 2006], М-КСФ и ГМ-КСФ [Yamada et al., 2000]. Наиболее выраженный эффект оказывает сочетание нескольких факторов; так, комбинация EGF, PDGF, bFGF и IGF-1 обеспечивает эффективное размножение МСК в бессывороточной среде [Gronthos, Simmons, 1995]. Известны и ингибиторы роста МСК – в частности, ИЛ-3 в высоких дозах [Li et al., 2006] и глюкокортикоидные гормоны – гидрокортизон и декасметазон [Minguell et al., 1982; Walsh et al., 2001; Wei et al., 2001].

Действие этих и других факторов не ограничивается только влиянием на пролиферацию. Для PDGF показана способность стимулировать миграцию MCK [Fiedler et al., 2004; Gruber et al., 2004], EGF способствует их выживанию, повышает подвижность [Tamama et al., 2006] и усиливает остеогенные потенции [Kratchmarova et al., 2005], IGF-1 индуцирует жировую [Scavo et al., 2004] и хрящевую [Spagnoli et al., 2005] дифференцировку. Стимулировать дифференцировку MCK в различных направлениях способны также глюкокортикоиды [Owen et al., 1987; Walsh et al., 2001; Atmani et al., 2003] и bFGF [Hanada et al., 1997; Zhang et al., 2002; Neubauer et al., 2004; Hankemeier et al., 2005; Solchaga et al., 2005; Guillot et al., 2007]. Последний, кроме того, увеличивает длительность пролиферации MCK *in vitro*, способствует сохранению ими фибробластоподобной морфологии и препятствует потере потенций в ходе пассирования [Martin et al., 1997; Tsutsumi et al., 2001; Bianchi et al., 2003; Hankemeier et al., 2005]. Есть данные, что на субпопуляции MCK различной степени зрелости bFGF действует неодинаковым образом, стимулируя пролиферацию коммитированных клеток и поддерживая некоммитированные в состоянии покоя [Benavente et al., 2003]. Всё это свидетельствует в пользу критической роли данного фактора в самоподдержании MCK.

Помимо растворимых биоактивных молекул, на поведение МСК в культуре могут влиять и другие условия. Так, культивирование стромальных клеток костного мозга при пониженном содержании кислорода повышает эффективность клонирования КОЕ-Ф [Gupta et al., 1987], усиливает пролиферативную активность МСК и их дифференцировку [Ren et al., 2006]. На рост МСК влияет и материал субстрата, причем не только его химический состав и присутствие на поверхности тех или иных компонентов внеклеточного матрикса [Hori et al., 2004; Chen et al., 2007], но и механические свойства; в частности, при культивировании на полиакриламидных гелях скорость пролиферации МСК прямо зависит от жесткости материала [Rowlands et al., 2008]. Известно также, что при культивировании МСК в трехмерном окружении экспрессия рецепторов адгезии и организация фокальных контактов отличаются от таковых в монослойной

культуре [Docheva et al., 2007], что может служить причиной различий в поведении клеток. Показано, например, что МСК, культивируемые на трехмерной волокнистой основе из полиэтилентерефталата, пролиферируют медленнее, чем в двумерной культуре, и, в отличие от нее, активно секретируют белки внеклеточного матрикса [Grayson et al., 2004].

2.5. Потенции к дифференцировке

2.5.1. Остеогенез

Остеогенные потенции стромальных клеток костного мозга были впервые отмечены еще в экспериментах Фриденштейна по трансплантации клеток костного мозга в перитонеальную полость животных-реципиентов в диффузионных камерах [Фриденштейн и др., 1970; Friedenstein et al., 1987], а также по эктопической трансплантации под капсулу почки фрагментов костного мозга [Friedenstein et al., 1978] либо суспензии его клеток, нанесенной на пористую губку [Friedenstein et al., 1982]. Подтверждением роли МСК в остеогенезе, наблюдаемом в этих экспериментальных моделях, служат результаты трансплантации очищенной популяции МСК в керамических блоках из фосфата кальция, что приводит к образованию костной ткани в порах носителя [Hanada et al., 1997; Kadiyala et al., 1997].

При культивировании МСК *in vitro* начальные стадии их остеогенной дифференцировки могут проходить спонтанно, без добавления специфических индукторов. О коммитировании клеток к остеогенезу можно судить по активности ЩФ, которая отмечается в части колоний, образуемых КОЕ-Ф в стандартной ростовой среде [Owen et al., 1987; Phinney et al., 1999 a, b]. Этот фермент появляется на ранних стадиях дифференцировки клеток в остеобласты, еще до появления явных морфологических изменений. Впрочем, следует отметить, что в ходе остеогенза *in vitro* клетки длительное время остаются морфологически неотличимыми от фибробластов, приобретая типичные признаки остеобластов лишь на завершающих стадиях дифференцировки [Aubin, Liu, 1996; Ducy et al., 2000].

Терминальная остеогенная дифференцировка МСК, приводящая к образованию минерализованных костных узелков, требует определенных индукторов. Она проходит в три этапа, включающие пролиферацию остеогенных клеток, выработку и созревание внеклеточного матрикса и его минерализацию [Stein, Lian, 1993]. Классический метод индукции остеогенеза *in vitro* состоит в инкубации конфлюэнтного монослоя МСК с дексаметазоном, аскорбиновой кислотой и β-глицерофосфатом [Chen et al., 1997; Jaiswal et al., 1997]. В присутствии этих веществ МСК костного мозга, группируются в плотные узелки и усиливают экспрессию ЩФ, а позднее приобретают морфологию остеобластов (кубическую или полигональную форму и

интенсивную базофилию цитоплазмы) и откладывают внеклеточный матрикс, состоящий преимущественно из коллагена I типа и содержащий также остеокальцин, остеонектин, остеопонтин и костный сиалопротеин [Scutt, Bertram, 1995; Kalajzic et al., 2003; Marom et al., 2005; Fromigué et al., 2008]. Процесс дифференцировки завершается отложением в матриксе солей кальция (гидроксиапатита). Формирование минерализованных костных узелков требует нескольких недель, при этом степень минерализации повышается, если в среде накапливаются растворимые продукты клеток, что говорит о роли аутокринных или паракринных факторов в прогрессии остеогенеза [Jaiswal et al., 1997]. Есть данные, что дексаметазон обеспечивает осуществление ранних стадий остеогенеза, индуцируя дифференцировку МСК в остеобласты, сопровождающуюся усилением экспрессии ЩФ [Walsh et al., 2001; Atmani et al., 2003]. Программа костной дифференцировки может быть активирована и другим глюкокортикоидным гормоном – гидрокортизоном [Owen et al., 1987]. Аскорбиновая кислота и β-глицерофосфат существенны для прохождения более поздних стадий остеогенеза – образования и минерализации внеклеточного матрикса [Bellows et al., 1986; Coelho, Fernandes, 2000].

Помимо вышеназванных веществ, остеогенную дифференцировку стимулируют костный морфогенетический белок ВМР-2, проявляющий синергизм с оксистеролами и с bFGF [Hanada et al., 1997; Kadowaki et al., 2004; Kha et al., 2004], а также ВМР-7 [Chaudhary et al., 2004] и простагландин E2 [Scutt, Bertram, 1995]. Ингибирующее влияние на остеогенез оказывают, в частности, noggin [Kalajzic et al., 2003], LIF и онкостатин М [Gimble et al., 1994], кальцитриол [Atmani et al., 2003]. По-видимому, вещества, подавляющие остеогенную дифференцировку, содержатся в сыворотке: эффективность образования кости *in vivo* повышается, если перед имплантацией проинкубировать МСК в бессывороточной среде [Kuznetsov et al., 2000].

Для дифференцировки МСК в костную ткань важны их взаимодействия с внеклеточным матриксом через интегрины [Salasznyk et al., 2004; Klees et al., 2005; Martino et al., 2009]. Показана роль в регуляции остеогенной дифференцировки также и других присутствующих на МСК молекул адгезии, таких как ALCAM [Bruder et al., 1998] и кадгерин 11 [Kii et al., 2004].

На молекулярно-генетическом уровне ключевыми регуляторами остеогенеза являются факторы транскрипции Runx2 (cbfa-1) и Osterix. Runx-2 активируется под воздействием TGF-β1 и BMP-2 и через два независимых сигнальных пути, опосредованных этими факторами, контролирует экспрессию генов, кодирующих основные белки костного матрикса. Экспрессия гена Runx2 может быть также опосредована через сигнальные пути Wnt и Indian hedgehog. Osterix участвует в Runx2-независимых путях регуляции остеогенеза, прежде всего через BMP-2, и, по-видимому, действует на более поздних стадиях дифференцировки, чем Runx2 [Кожевникова и др., 2008 б]. В сигнальных путях, контролирующих костную дифференцировку MCK, важную роль играют протеинкиназы ERK и JNK. ERK активируется на ранних этапах

остеогенеза, JNK – на стадии отложения и минерализации внеклеточного матрикса [Jaiswal et al., 2000]. К активации ERK приводит, в частности, связывание клеток с ламинином-5, после чего эта киназа фосфорилирует Runx2 [Klees et al., 2005].

2.5.2. Адипогенез

Адипогенная дифференцировка МСК, как и остеогенная, требует специфических индукторов. В их качестве могут выступать стероидные гормоны. Культивирование стромальных клеток в среде с дексаметазоном или гидрокортизоном достаточно для их дифференцировки в адипоциты [Bennett et al., 1991; Gimble et al., 1994; Phinney et al., 1999 a; Cui et al., 2000; Shi et al., 2000]. Хотя эти гормоны усиливают пролиферацию стромальных клеток, дифференцирующихся в адипоциты [Greenberger, 1979; Atmani et al., 2003], по крайней мере, для МСК человека показана возможность адипогенеза и без пролиферации [Janderova et al., 2003]. Дифференцировка МСК в жировую ткань наблюдается не только при добавлении стероидов в культуру, но и *in vivo* при введении метилпреднизолона животным-реципиентам после трансплантации этих клеток [Cui et al., 2000]. Оптимальные условия для жировой дифференцировки MCK *in vitro* создаются при сочетании в среде дексаметазона, инсулина, индометацина и изобутилметилксантина (IBMX) [Götherström et al., 2003; Lee et al., 2004; Mirmalek-Sani et al., 2006] либо при поочередном культивировании клеток в индукционной среде такого состава и в поддерживающей среде, содержащей только инсулин [Janderova et al., 2000; Neubauer et al., 2004; Scavo et al., 2004; Neuhuber et al., 2008]. Вместо инсулина в протоколах индукции адипогенеза может быть использован IGF-1, причем его наномолярные концентрации оказывают такой же эффект, как микромолярные концентрации инсулина [Scavo et al., 2004]. Существуют и другие индукторы адипогенеза – в частности, росиглитазон [Fink et al., 2004; Case et al., 2013]. В экспериментах по изучению дифференцировки МСК костного мозга и нескольких мультипотентных линий эмбриональных фибробластов было показано их превращение в адипоциты под действием 5-азацитидина. Однако он не является специфическим индуктором адипогенеза – его присутствие в среде приводит к дифференцировке клеток и в других направлениях [Taylor, Jones, 1979; Wakitani et al., 1995]. Коммитирование мультипотентных клеток к адипогенезу может быть вызвано костным морфогенетическим белком ВМР-4, но для дальнейшей дифференцировки требуется добавление других индукторов [Tang et al., 2004]. Среди ингибиторов адипогенной дифференцировки известны TGF-β [Zhou et al., 2004; Ahdjoudj et al., 2005], оксистеролы [Kha et al., 2004], BMP-2 [Gimble et al., 1995], a также ряд кроветворных цитокинов – ИЛ-6, ИЛ-11, LIF [Gimble et al., 1994].

Клетки, коммитированные к адипогенезу, прекращают пролиферацию и округляются, что важно для реализации ими адипогенной программы [Spiegelman, Ginty, 1983; Gregoire et al., 1998; McBeath et al., 2004]. В цитоплазме появляются белки, ответственные за метаболизм жирных кислот, транспорт и накопление липидов (адипофилин, aP2, липопротеиновая липаза, глицерол-3-фосфатдегидрогеназа), и множественные включения нейтральных жиров [Cui et al., 2000; Janderova et al., 2000; Fink et al., 2004; Neubauer et al., 2004; Scavo et al., 2004]. Несмотря на морфологические отличия от унилокулярных адипоцитов белой жировой ткани, адипоциты, полученные при индукции дифференцировки МСК, характеризуются тем же путем передачи липолитических сигналов и теми же эндокринными функциями – в частности, продукцией адипонектина и лептина [Ryden et al., 2003; Fink et al., 2004]. Адипогенез сопровождается изменением состава и структуры внеклеточного матрикса, в частности, исчезновением фибронектина, деградацией сети коллагена IV типа и ламинина с сосредоточением этих белков на поверхности клеток, а также появлением коллагена III, V и VI типов [Kubo et al., 2000].

Центральными регуляторами адипогенеза являются факторы транскрипции PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) и несколько изоформ C/EBP (α , β и δ), активация которых ведет к включению экспрессии генов, ответственных за метаболизм липидов и их накопление в клетке. Экспрессия этих факторов возрастает в ответ на действие индукторов адипогенеза [Gregoire et al., 1998]. Показано, в частности, что в МСК костного мозга дексаметазон индуцирует экспрессию C/EBP δ , который связывается с промотором гена PPAR- γ 2, активируя его [Shi et al., 2000]. Однако описана линия преадипоцитов, не отвечающая на стимуляцию PPAR- γ 2, но, тем не менее, подвергающаяся жировой дифференцировке под действием гидрокортизона, индометацина и IBMX [Torii et al., 2003], то есть возможны и альтернативные пути регуляции адипогенеза.

Известно также, что экспрессия и активность факторов транскрипции, регулирующих адипогенез, чувствительны к механическим воздействиям. Так, при разгрузке скелета в МСК костного мозга усиливается экспрессия С/ЕВР α и С/ЕВР $\beta\alpha$, а затем и РРАR- γ 2, что ведет к усиленной адипогенной дифференцировке [Ahdjoudj et al., 2005]. Напротив, под действием механического напряжения, являющегося *in vitro* аналогом физических упражнений, в МСК предотвращается индуцируемая адипогенной средой экспрессия С/ЕВР β и РРАR- γ 2, а жировая дифференцировка подавляется [Styner et al., 2012; Case et al., 2013].

2.5.3. Хондрогенез

Способность стромальных клеток костного мозга к хондрогенезу *in vivo* была показана при их трансплантации животным-реципиентам в диффузионных камерах [Ashton et al., 1980;

Ваb et al., 1986; Friedenstein et al., 1987] и на пористых керамических носителях [Kadiyala et al., 1997; Pittenger, Marshak, 2001]. Наряду с костной тканью в этих экспериментальных моделях иногда формируется и хрящевая. Отмечена неодинаковая локализация этих тканей в трансплантате: в диффузионных камерах хрящ располагается преимущественно в центре, а кость – вблизи мембранных фильтров [Bab et al., 1986]; на носителях остеогенез преобладает в сообщающихся порах, а хондрогенез – в порах с закрытыми концами, куда затруднено врастание сосудов реципиента [Pittenger, Marshak, 2001]. По-видимому, эти различия отражают меньшую, чем у костной ткани, потребность хряща в снабжении кислородом. Стимулирующее влияние гипоксии на хондрогенную дифференцировку МСК показано также *in vitro* в индукционной среде [Kanichai et al., 2008].

Образование хрящевой ткани *in vitro* требует непосредственного взаимодействия между дифференцирующимися клетками наряду с отсутствием их адгезии к субстрату [Solursh, 1991]. Хотя некоторые признаки хондрогенеза под влиянием индукторов могут наблюдаться в монослойной культуре MCK [Worster et al., 2001; Naruse et al., 2004; Kanichai et al., 2008], оптимальные условия для их дифференцировки достигаются в микромассовых культурах, обеспечивающих формирование трехмерных клеточных агрегатов [Johnstone et al., 1998; Yoo et al., 1998; Hanada et al., 2001; Indrawattana et al., 2004]. Эффективная хондрогенная дифференцировка MCK показана также при их культивировании в гелях и на трехмерных носителях из природных или синтетических полимеров [Huang et al., 2004; Yokoyama et al., 2005; Glennon-Alty et al., 2012; Murphy et al., 2012; Pelaez et al., 2012; Kwon, 2013] или на субстратах с микроструктурой, препятствующей распластыванию [Gao et al., 2010].

Как правило, хондрогенную дифференцировку МСК анализируют в бессывороточной среде, содержащей те или иные индукторы. Наиболее мощным из них является TGF-β [Johnstone et al., 1998; Yoo et al., 1998; Huang et al., 2004; Weiss et al., 1010], менее выраженным действием обладает дексаметазон [Johnstone et al., 1998; Derfoul et al., 2006]. Другие факторы – BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, IGF-1 - усиливают индуцированный TGF-β хондрогенез, но сами не вызывают его [Weiss et al., 2010]. Для наиболее эффективной дифференцировки в состав среды обычно включают одновременно TGF-β и дексаметазон [Johnstone et al., 1998; Mackay et al., 1998; Lin et al., 2005; Derfoul et al., 2006], иногда с добавлением BMP-2 [Yokoyama et al., 2005] или BMP-6 [Sekiya et al., 2002 b]. При культивировании MCK на полимерных субстратах, создающих трехмерное окружение, хондрогенез может идти и без индукторов; при этом имеют значение химический состав субстрата и его эластичность [Glennon-Alty et al., 2012; Murphy et al., 2012; Kwon, 2013]. МСК, культивируемые в гелях различного состава, могут также быть индуцированы к хондрогенезу с помощью механического воздействия

(динамического сжатия геля), приводящего к усилению экспрессии клетками эндогенного TGFβ [Huang et al., 2004] и активации сигнального пути ERK1/2 [Pelaez et al., 2012].

В ходе хондрогенной дифференцировки МСК в микромассовых культурах клетки округляются, приобретают морфологию хондроцитов и окружаются метахроматически окрашивающимся внеклеточным матриксом, содержащим коллаген II типа, аггрекан и другие протеогликаны, характерные для хряща [Johnstone et al., 1998; Worster et al., 2001; Sekiya et al., 2002 b; Indrawattana et al., 2004]. На поверхности агрегата формируется слой уплощенных клеток, подобный надхрящнице; расположенные под ним клетки первыми начинают синтезировать коллаген II типа. Постепенно дифференцировка распространяется по всему агрегату, в последнюю очередь затрагивая его центральную часть. В первую неделю индукции размер агрегатов изменяется мало, но в дальнейшем они увеличиваются в 2-3 раза [Pittenger, Marshak, 2001]. На поздних стадиях хондрогенеза отмечаются признаки гипертрофии хряща – отложение коллагенов I и X типа, появление активности ШФ [Johnstone et al., 1998; Yoo et al., 1998; Hanada et al., 2001; Lin et al., 2005; Weiss et al., 2010]. Дифференцировке МСК до стадии гипертрофированных хондроцитов способствует удаление из среды ТGF-β, снижение концентрации дексаметазона и добавление тироксина [Mackay et al., 1998]; добавление bFGF на поздних стадиях дифференцировки, напротив, препятствует гипертрофии [Weiss et al., 2010].

Изучение молекулярных механизмов регуляции хондрогенеза показало, что важнейшую роль в ней играет фактор транскрипции Sox9, активация которого приводит, в частности, к включению генов коллагена II типа и аггрекана [de Crombrugghe et al., 2000]. Индукция экспрессии Sox9 показана при культивировании МСК в хондрогенной среде с TGF-β [Lin et al., 2005]. Влияние TGF-β на хрящевую дифференцировку опосредуется двумя сигнальными путями – через сигнальные молекулы семейства SMAD [Massague, Wotton, 2000] и через митоген-активируемую протеокиназу MAPK [Tuli et al., 2002]. Кроме того, при стимуляции хондрогенеза TGF-β проявляет синергизм с Wnt, то есть активация сигнального пути через Wnt может быть одним из механизмов влияния TGF-β на хондрогенез [Zhou et al., 2004].

2.5.4. Дифференцировка в другие мезенхимные и мезодермальные производные

Наряду с хорошо изученными потенциями МСК к остео-, адипо- и хондрогенезу, показана их способность дифференцироваться в ряд других тканей, происходящих в эмбриогенезе из мезенхимы, а также из мезодермы (являющейся, как известно, главным источником мезенхимных элементов). Так, под влиянием ВМР-12 и ВМР-13 МСК приобретают морфологические и фенотипические черты **фиброцитов сухожилий и связок** – вытягиваются, формируют переплетающиеся отростки, усиливают экспрессию теномодулина, коллагена I типа

и тенасцина-С [Wang et al., 2005 b; Haddad-Weber et al., 2010; Lee et al., 2011]. Индукция дифференцировки МСК в этом направлении возможна также при их совместном культивировании с клетками связок [Kramer et al., 2004] или сухожилий [Lovati et al., 2012] либо под воздействием механических стимулов, а именно натяжения коллагенового геля, служащего субстратом для культивирования клеток [Altman et al., 2002]. По некоторым данным, механизмы теногенной дифференцировки МСК в ответ на механическое растяжение могут быть связаны с ремоделированием внеклеточного матрикса и изменением экспрессии генов Wnt [Kuo, Tuan, 2008]. Для дифференцировки МСК в теноциты достаточна их трансдукция генами транскрипционных факторов Smad8 [Hoffmann et al., 2006] и scleraxis (Scx) [Alberton et al., 2012], что свидетельствует об участии этих молекул в контроле теногенеза.

МСК традиционно рассматриваются также как предшественники стромы органов гемопоэза, являющейся морфологическим субстратом кроветворного микроокружения. Способность стромальных клеток к переносу кроветворного микроокружения показана в опытах по эктопической трансплантации тканевых фрагментов костного мозга [Friedenstein et al., 1978; Schofield, 1986] или его клеток, размноженных in vitro [Friedenstein et al., 1982; Owen, 1988]. В обоих случаях в трансплантате образуется de novo костномозговой орган со стромой донорского происхождения, заселяемой кроветворными клетками реципиента. Способность стромальных клеток костного мозга и других органов гемопоэза к поддержанию пролиферации и дифференцировки кроветворных клеток неоднократно показана in vitro [Itoh et al., 1989; Yanai et al., 1989; Rios, Williams, 1990; Tsuchiyama et al., 1995: Majumdar et al., 1998; Charbord et al., 2000; Seshi et al., 2000], хотя характеристика этого направления дифференцировки МСК затруднена гетерогенностью клеточного состава кроветворной стромы и отсутствием четких морфологических и фенотипических признаков, позволяющих идентифицировать ее зрелые элементы. Анализ экспрессии цитоскелетных и матриксных белков линиями стромальных клеток кроветворных органов выявил в них ряд антигенов, характерных для сосудистых гладких миоцитов – в частности, α-гладкомышечного актина, специфической изоформы фибронектина EDa⁺, hl-кальпонина, метавинкулина, h-кальдесмона, гладкомышечных форм αактинина и миозина, что может отражать близость стромальной дифференцировки к et al., 2002; Dennis, Charbord, 2002]. При этом линии, гладкомышечной [Charbord экспрессирующие маркеры ранних и средних стадий гладкомышечной дифференцировки, наиболее способны к поддержанию пролиферации примитивных кроветворных клеток [Charbord et al., 2000]. Одновременно с белками, характерными для миоцитов, стромальные клетки длительных культур костного мозга экспрессируют маркеры адипоцитов, остеобластов и фибробластов [Seshi et al., 2000]. Однако основным критерием стромальной дифференцировки МСК служит усиление их способности к секреции кроветворных цитокинов и поддержанию
гемопоэза, хотя в некоторой степени эта способность свойственна и недифференцированным MCK [Haynesworth et al., 1996; Majumdar et al., 1998; 2000]. В качестве индукторов, способствующих приобретению ими стромального фенотипа, могут выступать ИЛ-1α [Haynesworth et al., 1996] или гидрокортизон в сочетании с сывороткой лошади [Majumdar et al., 1998], а также сокультивирование с СКК [Mbalaviele et al., 1999].

Несмотря на существование в кроветворных органах и периферической крови специфических родоначальных клеток эндотелия, предположительно происходящих из гемангиобластов и гистогенетически родственных кроветворным, а не стромальным клеткам [Ingram et al., 2004; Cherqui et al., 2006], образование эндотелиоцтов может быть и результатом дифференцировки MCK. При культивировании в специальной среде, содержащей VEGF, MCK приобретают маркеры эндотелия, в частности, KDR, FLT-1 и фактор фон Виллебранда [Campioni et al., 2003; Oswald et al., 2004]. Эндотелиальной дифференцировке MCK *in vitro* способствует также механическое воздействие поперечной силы сдвига [Fischer et al., 2009 a; Janeczek Portalska et al., 2012]. МСК, коммитированные к дифференцировке в эндотелий, способны формировать капилляроподобные трубчатые структуры *in vitro* при пересеве на матригель и кровеносные сосуды *in vivo* при трансплантации экспериментальным животным [Oswald et al., 2004; Liu et al., 2007; Fischer et al., 2009 a; Janeczek Portalska et al., 2012]. Кроме того, они демонстрируют такие функциональные характеристики эндотелия, как поглощение ацетилированных липопротеинов низкой плотности [Sreerekha et al., 2006; Fischer et al., 2009 a; Janeczek Portalska et al., 2012] и выделение NO [Sreerekha et al., 2006].

Еще одно направление дифференцировки МСК - миогенез. Под влиянием TGF-β они могут приобретать фенотип гладких миоцитов, содержащих α-гладкомышечный актин и кальпонин [Seruya et al., 2004; Papaccio et al., 2006; Gao et al., 2010]. В отличие от хондрогенеза, также индуцируемого TGF-β, эта дифференцировка требует распластывания клеток [Gao et al., 2010] и эффективно происходит на поверхности, покрытой коллагеном IV типа [Seruya et al., 2004]. Неоднократно была показана дифференцировка МСК в сердечную или скелетную мышечную ткань. В качестве индуктора их кардиомиогенной дифференцировки наиболее известен 5-азацитидин, эффект которого связан с деметилированием ДНК, изменяющим активность генов. Обработка МСК этим веществом во многих случаях вызывает экспрессию ими маркеров, свойственных кардиомиоцитам – GATA-4, N-кадгерина, αсаркомерного актина, тропонина I, тропонина T, тяжелой цепи сердечного миозина [Wang et al., 2004 a; Duan et al., 2005; Zhang et al., 2005 a; Burlacu, 2006; Dong et al., 2006; Ye et al., 2006]. Ряд авторов, хотя и не все, отмечают под влиянием 5-азацитидина морфологические изменения появление вытянутых, иногда двуядерных клеток, содержащих миофиламенты и примитивные саркомеры, образование миотубоподобных структур со вставочными дисками

[Makino et al., 1999; Duan et al., 2005; Dong et al., 2006; Gornostaeva et al., 2006], а также синхронное спонтанное сокращение клеток [Makino et al., 1999] и экспрессию ими функционально полноценных адренергических и мускариновых рецепторов [Hakuno et al., 2002]. Спонтанно сокращающиеся клетки, образующие миотубоподобные структуры, могут быть получены из МСК также путем их совместного культивирования с кардиомиоцитами [Tomita et al., 2002], а для стромальных клеток жировой ткани (но не костного мозга) показан кардиомиогенез в метилцеллюлозной культуре с ИЛ-3, ИЛ-6 и SCF [Planat-Benard et al., 2004]. Под действием некоторых индукторов, в частности, 5-азацитидина [Krupnick et al., 2004], стероидных гормонов [Warejcka et al., 1996; Gang et al., 2004], галектина-1 [Chan et al., 2006] МСК могут приобретать признаки дифференцировки в скелетные мышцы – экспрессировать специфические маркеры MyoD и миогенин и сливаться в многоядерные миотубы, содержащие десмин и миозин. Потенции МСК к скелетному миогенезу проявляются также в способности к слиянию с миобластами или миосателлитами при сокультивировании с ними [Shi et al., 2004; Machaj et al., 2005; Di Rocco et al., 2006; Laino et al., 2006]. Впрочем, способность МСК к дифференцировке в скелетные мышцы в ответ на те или иные индукторы подтверждается не всеми авторами и, видимо, неодинакова для клеток из разных органов и на разных стадиях онтогенеза [Gang et al., 2004; Balana et al., 2006; Chan et al., 2006].

2.5.5. Дифференцировка в экто- и энтодермальные производные

Долгое время в биологии существовало представление, что соматические стволовые клетки половозрелого организма способны образовывать специализированные элементы лишь тех тканей, в которых находятся сами; в частности, потенции МСК ограничены дифференцировкой в различные типы соединительных тканей и, возможно, в некоторые другие ткани мезенхимного (мезодермального) происхождения. Дифференцировка в производные других зародышевых листков считалась невозможной, однако результаты ряда недавних исследований заставляют усомниться в этом. Начиная с 2000-го года, стали появляться данные о том, что в определенных условиях МСК способны изменять свою специализацию и давать начало производным эктодермы и энтодермы. Наиболее многочисленны сообщения о «неортодоксальной» дифференцировке МСК в клетки нервной ткани и печеночного эпителия.

Возможность дифференцировки МСК в нейроноподобные клетки была впервые показана в экспериментах по обработке стромальных клеток костного мозга крысы или человека βмеркаптоэтанолом, что приводило к приобретению ими морфологии нейронов и экспрессии ряда нейрональных маркеров – в частности, нейронспецифической енолазы, NeuN, tau, белка нейрофиламентов [Woodbury et al., 2000]. В дальнейшем сходные результаты были получены

при индукции нейрогенной дифференцировки МСК различной органной локализации с помощью диметилсульфоксида [Chu et al., 2004], ретиноевой кислоты [Cho et al., 2005], ее сочетания с дибутирил-цАМФ и IBMX [Tio et al., 2010], ростовых факторов – в частности, NGF и нейротрофического фактора мозгового происхождения (BDNF) [Zavan et al., 2010], bFGF [Nagai et al., 2007] или HGF, VEGF и EGF [Bae et al., 2011]. С применением этих и других индукторов продемонстрирована также дифференцировка МСК в различные виды нейроглии – шванновские клетки, что подтверждается олигодендроциты, астроциты, появлением соответствующих маркеров, таких как глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), 2',3'циклонуклеотид-3-фосфодиэстераза (CNPaзa), S100 [Hermann et al., 2004; Safford et al., 2004; Suzuki et al., 2004; Zavan et al., 2010; Bae et al., 2011]. Имеются также сообщения о дифференцировке МСК в глиальные и/или нейроноподобные клетки в совместной культуре с клетками нервной ткани [Qu et al., 2004; Wislet-Gendebien et al., 2005; Krampera et al., 2007 a], под влиянием кондиционированной ими среды [Kennea et al., 2009] и in vivo при трансплантации в мозг [Qu et al., 2004]. Отмечено, что нейрогенез, индуцированный с помощью тех или иных методов, проходит через стадию превращения МСК в клетки с характеристиками нейральных стволовых, экспрессирующие характерный для них белок нестин и образующие нейросфероподобные структуры. На более поздних стадиях индукции эти клетки приобретают фенотип, свойственный нейронам или клеткам глии [Woodbury et al., 2000; Chu et al., 2004; Hermann et al., 2004; Suzuki et al., 2004]. Более того, в некоторых работах показано, что клетки, полученные в результате нейрогенной дифференцировки МСК, способны генерировать потенциал действия и отвечать на нейротрансмиттеры [Cho et al., 2005; Wislet-Gendebien et al., 2005; Song et al., 2007], то есть демонстрируют функциональные характеристики нейронов.

Признаки гепатоцитарной дифференцировки МСК отмечены при их культивировании в присутствии HGF в качестве единственного индуктора [Wang et al., 2004 b; Oyagi et al., 2006] или в среде, содержащей в том или ином сочетании HGF, FGF-4, онкостатин М и ряд других факторов роста [Lee et al., 2004; Shu et al., 2004; Kang et al., 2005; Shi et al., 2005; Chien et al., 2006; Talens-Visconti et al., 2007]. Клетки в этих условиях приобретают эпителиоподобную морфологию, экспрессируют ряд печеночных маркеров – тирозинаминтрансферазу, глюкозо-6альбумин – и проявляют фосфатазу. цитокератин-18, свойственную гепатоцитам функциональную активность (в частности, накапливают гликоген и секретируют мочевину). Сведения об экспрессии ими альфа-фетопротеина противоречивы: по одним данным, в дифференцирующихся в гепатоцитарном направлении МСК этот маркер незрелых печеночных клеток присутствует на уровне мРНК и белка [Wang et al., 2004 b; Kang et al., 2005; Oyagi et al., 2006], по другим – они дифференцируются непосредственно в зрелые гепатоциты, не экспрессирующие его [Shu et al., 2004]. В некоторых случаях МСК, культивируемые в индукционной среде, экспрессируют печеночные маркеры только в присутствии свежевыделенных клеток печени [Lange et al., 2005 a]. Сообщалось о стимулирующем влиянии сокультивирования с гепатоцитами на последующую печеночную дифференцировку МСК под действием факторов роста [Ong et al., 2006], а также о дифференцировке МСК в гепатоциты *in vivo* при введении в поврежденную печень [Sato et al., 2005]. Эти данные указывают на важность микроокружения, создаваемого зрелыми клетками печени, для гепатоцитарной дифференцировки МСК.

Другие направления «неортодоксальной» дифференцировки МСК в производные экто- и энтодермы, показанные в различных экспериментальных условиях *in vitro*, включают образование ими β-клеток поджелудочной железы [Moriscot et al., 2005], кератиноцитов [Sasaki et al., 2008], эпителия дыхательных путей [Spees et al., 2003] и желудка [Okumura et al., 2009]. Как правило, такая дифференцировка наблюдается под влиянием совместного культивирования с клетками соответствующих тканей или кондиционированных ими сред, хотя превращение МСК в клетки панкреатических островков, продуцирующие инсулин, показано также в ответ на индукционные среды определенного состава – в частности, с высокой концентрацией глюкозы, никотинамидом и β-меркаптоэтанолом [Chen et al., 2004 a; Silva et al., 2012].

2.5.6. Возможные механизмы пластичности

Способность тканеспецифических стволовых и родоначальных клеток приобретать фенотип дифференцированных клеток других тканей, неоднократно показанная в различных условиях in vitro и in vivo, получила название пластичности. Появление многочисленных экспериментальных данных, могущих свидетельствовать о возможности смены специфичности стволовых клеток и их дифференцировки через границы тканей и зародышевых листков, заставило подвергнуть сомнению общепринятую парадигму однонаправленной и необратимой дифференцировки. Некоторыми авторами была выдвинута альтернативная концепция стволовости как обратимого состояния, в которое может входить любая клетка, теряя свою специализацию и приобретая широкий спектр потенций [Zipori, 2005; Delorme et al., 2006]. Однако эту концепцию, согласно которой главной характеристикой систем со стволовыми клетками следует считать именно пластичность, а не самоподдержание или иерархическую организацию, разделяют далеко не все исследователи. Хотя разработанные недавно методы получения клеток с индуцированной плюрипотентностью [Takahashi, Yamanaka, 2006] и прямого перепрограммирования одного типа дифференцированных клеток в другой [Szabo et al., 2010], в том числе не требующие непосредственного вмешательства в геном [Plews et al., 2010], трансдифференцировки указывают на принципиальную возможность

тканеспецифических клеток или их дедифференцировки в клетки с более широким спектром потенций, многие авторы справедливо отмечают отсутствие бесспорных доказательств подобных превращений МСК и других стволовых/родоначальных клеток как in vivo, так и в индукционных средах in vitro, и призывают с осторожностью относиться к наблюдаемому феномену пластичности [Raff, 2003; Wagers, Weissman, 2004; Phinney, Prockop, 2007]. Действительно, во многих экспериментах пластичность МСК и иных тканеспецифических стволовых клеток утверждается лишь на основании оценки морфологии и антигенного фенотипа, без учета функциональных характеристик клеток. При этом используемые фенотипические маркеры не всегда высокоспецифичны. В частности, нестин, ВШ-тубулин и GFAP, считающиеся маркерами соответственно нейральных стволовых клеток, нейронов и астроцитов, конститутивно экспрессируются недифференцированными МСК (вероятно, выполняя в них функции, не связанные с нейрогенезом), и повышение их уровня, отмечаемое при культивировании в индукционной среде [Tondreau et al., 2004; Kamishina et al., 2006], не может являться достаточным доказательством нейрогенной дифференцировки. Аналогичная ситуация показана и в случае маркеров кардиомиогенеза: МСК костного мозга экспрессируют на уровне мРНК и белка сердечные формы тропонина I, актина и легкой цепи миозина и усиливают их экспрессию при обработке различными миогенными средами, не подвергаясь при этом функциональной дифференцировке в кардиомиоциты [Rose et al., 2008; Siegel et al., 2012].

В некоторых случаях картину «неортодоксальной» дифференцировки создают артефакты. В первую очередь это относится к случаям обработки МСК химическими индукторами (диметилсульфоксид, β-меркаптоэтанол) с целью индукции нейрогенеза. Под действием этих веществ клетки за короткое время приобретают пирамидальную форму с тонкими отростками, а иммуноцитохимически в них выявляются нейрональные маркеры, однако эти признаки являются результатом не дифференцировки, а цитотоксичности используемых индукторов, приводящей к изменению морфологии и неспецифическому связыванию антител поврежденными клетками [Lu et al., 2004].

Феномен кажущейся пластичности МСК может быть связан с гетерогенностью изучаемой популяции и возможным присутствием в ней примеси стволовых и родоначальных клеток другой специфичности. Известно, в частности, что костный мозг содержит стволовые клетки для скелетной и сердечной мышечной ткани, кишечного, печеночного и панкреатического эпителиев, нервной и других тканей, а также плюрипотентные клетки, способные к дифференцировке в производные всех зародышевых листков [Ratajczak et al., 2004; Kucia et al., 2005, 2006]. Существующие на сегодняшний день методы выделения МСК не позволяют надежно очистить популяцию от подобных клеток, а проявление свойственных им потенций может быть неверно интерпретировано как трансдифференцировка МСК.

Наконец, пластичность МСК, наблюдаемая при их трансплантации экспериментальным животным или сокультивировании с клетками других тканей, может объясняться слиянием с окружающими зрелыми клетками, неоднократно показанным в подобных ситуациях. В частности, было продемонстрировано, что таким образом МСК приобретают эпителиальный фенотип в совместной культуре с эпителием дыхательных путей [Spees et al., 2003] и желудочно-кишечного тракта [Ferrand et al., 2011]. Имеются данные о слиянии МСК с нейронами [Kemp et al., 2011] и кардиомиоцитами [Noiseux et al., 2006; Yang et al., 2012] *in vitro* и *in vivo*. Впрочем, известны примеры дифференцировки МСК в почечный эпителий, гепатоциты или клетки нервной ткани и без слияния [Sato et al., 2005; Wislet-Gendebien et al., 2005; Kennea et al., 2009; Singaravelu, Padanilam, 2009], так что этот механизм не может быть ответственным за все случаи пластичности. Тем не менее, *in vivo* подобные трансформации крайне редки; не исключено, что *in vitro* потенции МСК могут изменяться под влиянием условий культивирования, так что вопрос о существовании пластичности стволовых клеток в нормальном организме и ее возможной физиологической роли остается дискуссионным.

3. Структура популяции стромальных клеток

3.1. Гетерогенность популяции МСК

Популяция МСК характеризуется высокой степенью гетерогенности по морфологическим, фенотипическим и физиологическим характеристикам. Уже в ранних работах по изучению клонального роста КОЕ-Ф было отмечено, что в пределах одной культуры колонии значительно различаются по величине, что может свидетельствовать о неодинаковой способности клоногенных клеток к пролиферации [Owen et al., 1987]. Анализ анеуплоидии в ходе пассирования культур МСК также свидетельствует о неодинаковой скорости роста клонов и селективном преимуществе некоторых из них при длительном культивировании [Осипова и др., 2009]. Различна и плотность колоний, происходящих из КОЕ-Ф – одни клоны, повидимому, наиболее активно пролиферирующие, характеризуются компактным расположением клеток, в других, менее активных в пролиферативном плане, клетки расположены диффузно [Лебединская и др., 2005]. Показано, что КОЕ-Ф, образующие эти морфологические типы колоний, различаются по радиочувствительности: субпопуляции, формирующей рыхлые колонии, свойственна радиорезистентность, тогда как клетки-предшественники плотных колоний высокочувствительны к радиации [Колесникова и др., 1992].

В пассируемых культурах МСК присутствуют несколько морфологических типов клеток: тонкие веретеновидные фибробласты, крупные сильно распластанные и мелкие

округлые клетки [Colter et al., 2001; Javason et al., 2001; Prockop et al., 2001; Izadpanah et al., 2005]. Различия в их морфологии отражают неодинаковые степень зрелости, пролиферативную активность и потенции к дифференцировке. Так, было показано, что клонированная субпопуляция плоских клеток, выделенная из культуры костного мозга, в ходе пассирования быстро теряет адипо- и хондрогенные потенции, тогда как клонированные веретеновидные клетки сохраняют их [Neuhuber et al., 2008]. По данным Прокопа и соавторов [Prockop et al., 2001], веретеновидные клетки имеют более высокую скорость пролиферации по сравнению с распластанными (видимо, представляющими собой наиболее зрелую субпопуляцию MCK), а наибольшая скорость роста свойственна очень мелким круглым клеткам с высоким ядерноплазменным отношением, получившим название RS-клеток (rapidly self-renewing cells). RS-клетки отличаются от остальных клеток той же культуры по поверхностным эпитопам и экспрессии генов и обладают наибольшими потенциями к дифференцировке.

Антигенный фенотип МСК также неоднороден. В то время как одни поверхностные маркеры (в частности, CD73, CD90 и CD105) стабильно экспрессируются большинством клеток этого типа, экспрессия других (например, Stro-1, CD106, MSCA-1) демонстрирует вариабельность, по-видимому, связанную с различиями в потенциях и степени зрелости клеток [Boxall, Jones, 2012]. Показано, что субпопуляция МСК костного мозга человека, экспрессирующая CD56, отличается от лишенной этого антигена большей способностью к колониеобразованию, наличием хондрогенных и отсутствием адипогенных потенций [Battula et al., 2009], а повышенный уровень экспрессии CD146 характерен для трипотентных клонов MCK в противоположность унипотентным [Russell et al., 2010]. Гетерогенность популяции МСК проявляется и в неодинаковой активности ЩФ. Различия в экспрессии данного маркера наблюдаются как между клональными колониями, образуемыми КОЕ-Ф [Friedenstein e al., 1982; Owen et al., 1987; Phinney et al., 1999 a], так и между клетками одной колонии [Van Den Heuvel et al., 1991 a; Bianco et al., 2001]. Активность ЩФ в первичной культуре МСК не зависит от клоногенной способности клеток и экспрессии таких поверхностных антигенов, как CD105 и CD29, однако клетки, содержащие этот фермент, отличаются более крупным размером, меньшей скоростью роста и повышенными потенциями к остеогенезу [Kim et al., 2012 c].

Клетки в составе популяции МСК обладают неодинаковой чувствительностью к цитотоксическим агентам. При введении животным таких препаратов, как бусульфан, метотрексат, циклофосфамид [Nikkels et al., 1987; Nifontova et al., 2008], 5-ФУ [Старостин и др., 1995] или дипин [Домарацкая и др., 2005] часть содержащихся в костном мозге КОЕ-Ф выживают и сохраняют способность к колониеобразованию. Во многих случаях чувствительность МСК к цитотоксическим препаратам коррелирует с их положением в их гистогенетическом ряду. Так, к ингибитору синтеза ДНК цитозин арабинозиду устойчивы клетки с высоким пролиферативным потенциалом, образующие *in vitro* очень крупные колонии [Ben-Ishay et al., 1986]. При обработке 5-ФУ, по некоторым данным, избирательно сохраняются покоящиеся некоммитированные клетки, способные к самоподдержанию [Minguell et al., 2000; Conget et al., 2001], тогда как алкилирующий препарат дипин поражает, по-видимому, наиболее молодую категорию MCK с высоким репаративным потенциалом [Домарацкая и др., 2005].

Неодинаковы и адгезивные свойства МСК. При посеве в первичную культуру часть КОЕ-Ф прикрепляются к субстрату в первые часы или дни инкубации, тогда как другие клетки длительное время сохраняются в суспензии, не теряя при этом клоногенной способности [Wan et al., 2006; Буеверова и др., 2008]. Математический анализ структуры популяции стромальных клеток костного мозга выявил существование в ней субпопуляций клеток с различной степенью адгезивности к пластику и фибронектину [MacArthur et al., 2006]. Взаимосвязь между адгезивными свойствами МСК и другими их характеристиками не вполне ясна. Есть данные, что низкая способность прикрепляться к культуральному пластику свойственна наиболее ранним стромальным клеткам [Yamada et al., 2000; Tanaka-Douzono et al., 2001]; с другой стороны, сравнение субпопуляций МСК, прикрепляющихся к нему в разные сроки, не обнаруживает различий в их чувствительности к факторам роста и способности к основным дифференцировкам [Wan et al., 2006; Moлчанова и др., 2011].

Наконец, клоны и субпопуляции МСК, даже полученные из одного источника, различаются между собой по широте спектра возможных направлений дифференцировки [Owen, 1988; Muraglia et al., 2000; De Bari et al., 2001; Guilak et al., 2006; Russell et al., 2010] и по степени выраженности тех или иных потенций [Di Girolamo et al., 1999; Phinney et al., 1999 b; Sekiya et al., 2002 a; Gronthos et al., 2003].

Отчасти различия в свойствах клеток, составляющих популяцию МСК, связаны с влиянием микроокружения. Так, клетки, взятые из центральных и периферических областей одной и той же клональной колонии, могут обладать разными остеогенными и адипогенными потенциями. Предполагаемая причина этих различий – неодинаковая плотность расположения клеток в различных участках колонии, влекущая за собой различия в экспрессии регуляторных молекул (в частности, ингибитора сигнального пути Wnt Dkk-1) и компонентов внеклеточного матрикса, что предрасполагает клетки к тому или иному направлению дифференцировки [Di Girolamo et al., 1999; Gregory et al., 2005]. Но, несомненно, в значительной степени гетерогенность морфологических, фенотипических и функциональных характеристик МСК отражает внутренние различия между клетками, занимающими то или иное положение в гистогенетическом ряду, и может свидетельствовать о сложной, к настоящему времени еще недостаточно изученной, иерархической структуре популяции стромальных предшественников.

3.2. Возможная организация стромального дифферона

3.2.1. Коммитированные стромальные предшественники

Единой общепринятой модели гистогенетического ряда мезенхимных клеток в настоящее время не существует. В частности, не вполне ясным остается вопрос о том, как происходит коммитирование МСК к дифференцировке. Существует мнение, что, в отличие от кроветворного дифферона, характеризующегося строгой иерархией мультипотентных, олигопотентных и монопотентных клеток, в стромальном – выбор направления дифференцировки осуществляется на уровне мультипотентной клетки под влиянием сигналов микроокружения [Zipori, 2005]. Авторы этой гипотезы полагают, что различия в структуре популяции кроветворных и стромальных предшественников обусловлены неодинаковой потребностью организма в зрелых клетках этих тканей: если клетки, принадлежащие к различным рядам гемопоэза, должны постоянно образовываться в большом количестве, чему и способствует иерархическая организация кроветворного дифферона, то дифференцировка МСК происходит главным образом в ответ на необходимость репарации локальных повреждений той или иной ткани, что не требует постоянной продукции большого числа зрелых клеток.

Однако экспериментальные данные о существовании клонов МСК с различным набором потенций – как трипотентных, дифференцирующихся в костную, хрящевую и жировую ткани [Poliard et al., 1995; Zangi et al., 2006; Neuhuber et al., 2008; Wang et al., 2008], и квадрипотентных, обладающих, помимо вышеперечисленных потенций, способностью к миогенезу [Grigoriadis et al., 1988; De Bari et al., 2001] или дифференцировке в строму, поддерживающую формирование остеокластов [Dennis et al., 1999], так и моно- или бипотентных [Dennis et al., 1999; Guillak et al., 2006; Neuhuber et al., 2008] – свидетельствуют в пользу того, что коммитирование стромальных клеток происходит путем последовательного ограничения потенций. Попытка установить иерархическую организацию гистогенетического ряда МСК была предпринята в работе Муральи и соавторов [Muraglia et al., 2000], проанализировавших потенции 185 клонов стромальных клеток из костного мозга человека к остео-, хондро- и адипогенезу. Остеогенными потенциями обладали практически все изученные клоны, остео- и хондрогенными – 60-80% из них, способностью ко всем трем дифференцировкам - 30%. Монопотентных адипогенных или хондрогенных, а также бипотентных остео-адипогеных и хондро-адипогенных клонов обнаружено не было. На этом основании авторы предположили, что дифференцировка МСК происходит согласно иерархической модели с последовательной потерей потенций: от трипотентного остео-хондроадипогенного предшественника через бипотентный остео-хондрогенный к монопотентному

остеогенному. Однако позднее в костном мозге были обнаружены и немногочисленные клоны МСК с другим сочетанием потенций, что может указывать на более сложный характер коммитирования. Возможно, оно происходит случайным образом во всех возможных направлениях, но условия микроокружения благоприятствуют сохранению клеток с хондроостеогенным и остеогенным фенотипами, чем и объясняется их количественное преобладание над остальными вариантами моно- и бипотентных MCK [Russell et al., 2010].

Ряд экспериментальных данных указывают на то, что в стромальном диффероне, в отличие от кроветворного, потеря потенций не является необратимым процессом. В частности, хондроциты суставного хряща способны к дедифференцировке до стадии мультипотентных клеток, сходных с МСК костного мозга по антигенному фенотипу и способных на клональном уровне к остеогенезу, адипогенезу и хондрогенезу [de la Fuente et al., 2004]. Сообщалось также, что адипоциты, полученные путем индукции жировой дифференцировки МСК, могут дать начало клонам менее дифференцированных клеток, формирующим костную ткань при имплантации животным-реципиентам в диффузионных камерах [Bennett et al., 1991]. Таким образом, коммитированные и даже дифференцированные клетки, видимо, способны к репрограммированию в пределах стромального дифферона и могут менять направление дифференцировки под влиянием соответствующих индукторов или условий микроокружения.

3.2.2. Предполагаемые мезенхимные стволовые клетки

Очевидно, далеко не все мезенхимные клетки, обладающие мультипотентностью, являются истинно стволовыми, то есть способными к самоподдержанию в течение жизни организма. Так, для трипотентных клонов, выделенных из костного мозга, характерна потеря потенций к дифференцировке по мере роста числа удвоений [Muraglia et al., 2000], что свидетельствует об их принадлежности к компартменту коммитированных клеток.

Кандидатами на роль некоммитированных стволовых клеток стромального дифферона являются вышеупомянутые RS-клетки – минорная субпопуляция быстро пролиферирующих клеток, присутствующая в культурах костного мозга [Colter et al., 2001; Prockop et al., 2001; Smith et al., 2004]. Проточно-цитометрический анализ по прямому и боковому светорассеянию позволил выявить среди них два подтипа – мелкие агранулярные RS-1 клетки, 90% которых находятся в G1-фазе клеточного цикла, и пролиферирующие мелкие гранулярные RS-2 клетки. Соотношение этих подтипов меняется в ходе культивирования: RS-1 клетки присутствуют в основном в конце фазы экспоненциального роста и в стационарной фазе, тогда как RS-2-клетки появляются в конце лаг-фазы, а к концу фазы экспоненциального роста исчезают. Предполагается, что RS-клетки вступают в пролиферацию под влиянием факторов,

продуцируемых более зрелыми клетками стромы; при этом асимметричное деление RS-2клетки приводит к образованию RS-1 клетки и зрелой MCK [Colter et al., 2000, 2001; Javason et al., 2001; Prockop et al., 2001]. По сравнению с более зрелыми МСК, RS-клетки обладают повышенной способностью к клональному росту и основным дифференцировкам [Colter et al., 2001; Prockop et al., 2001], а также эффективнее приживляются в организме животныхреципиентов [Lee et al., 2006]. Они экспрессируют ряд поверхностных эпитопов, отсутствующих на зрелых МСК, в частности, аннексин II, рецепторы VEGF, NGF и трансферрина, однако лишены экспрессируемых частью зрелых клеток антигенов Stro-1, CD10, CD147, а также рецепторов PDGF и EGF, и характеризуются более слабой экспрессией CD90, CD105, CD29, CD166, CD44, CD49e, CD54 и CD13 [Colter et al., 2001; Zhou et al., 2005]. Вместе с тем популяция RS-клеток не является гомогенной. Так, экспрессия рецептора SCF CD117 и эпитопа множественной лекарственной устойчивости свойственна лишь некоторым из RSклеток [Colter et al., 2001]. Кроме того, среди RS-1 клеток описаны три субпопуляции, различающиеся по степени зрелости, морфологии и потенциям к дифференцировке: наиболее ранние RS-1А-клетки с максимальными адипогенными потенциями; RS-1B с более высокой способностью к хондрогенезу, и поздние RS-1C [Sekiya et al., 2002 a].

Субпопуляции МСК, предположительно являющиеся наиболее примитивными в гистогенетическом ряду стромальных клеток, были описаны и другими авторами. В частности, среди МСК костного мозга, выживающих после воздействия 5-ФУ, обнаружена популяция покоящихся клеток, способных к самоподдержанию и продукции коммитированных остеогенных и адипогенных предшественников [Conget et al., 2001]. Клетки со сходными свойствами могут быть выделены из костного мозга человека методом магнитного или флуоресцентного сортинга как популяция с фенотипом Stro-1^{bright}/VCAM-1⁺; для них показаны нахождение вне цикла, конститутивная активность теломеразы, способность к активной пролиферации и мультипотентность [Gronthos et al., 2003].

Остается неясным, насколько перечисленные популяции идентичны друг другу, однако, судя по их характеристикам, они могут представлять собой наиболее ранние стромальные клетки с характеристиками истинно стволовых.

3.2.3. Общие предшественники стромальных и кроветворных клеток

Стромальные и кроветворные клетки традиционно считаются гистогенетически независимыми друг от друга, несмотря на их мезенхимное происхождение и колокализацию в органах гемопоэза. Такое мнение подтверждается клиническими данными об отсутствии донорских МСК в костном мозге реципиентов после трансплантации аллогенных СКК [Коç et al., 1999]. Нет и сообщений о способности трансплантированных МСК восстанавливать гемопоэз после летального облучения. Однако некоторые данные позволяют предполагать наличие у кроветворных и мезенхимных стволовых клеток общего предшественника. Так, еще в 80-ых годах при изучении длительных культур костного мозга пациентов с клональными миелопролиферативными заболеваниями было обнаружено, что в некоторых случаях строма этих культур происходит из того же клона, который вовлечен в опухолевый рост кроветворных клеток [Singer et al., 1984]. Те же авторы показали, что трансформация адгезивных клеток длительных костного мозга вирусом SV40 позволяет получить культур линии. дифференцирующиеся на клональном уровне в клетки с характеристиками стромальных и кроветворных [Singer et al., 1987]. Затем последовало сообщение об обнаружении в костном мозге плода человека примитивных клеток с фенотипом CD34⁺HLA-DR⁻CD38⁻, дающих начало одновременно и кроветворным клеткам, и элементам их стромального микроокружения [Huang, Terstappen, 1992], но впоследствии подтвердить эти результаты не удалось [Huang, Terstappen, 1994; Waller et al., 1995]. Однако в дальнейшем из костного мозга половозрелой собаки были получены клоны стромальных клеток с морфологией фибробластов, способных как к организации кроветворного микроокружения, так и к дифференцировке в кроветворные клетки [Huss et al., 1995], а из костного мозга мыши – неадгезивные к пластику клетки, восстанавливающие кроветворение облученного реципиента и приживающиеся в его костной ткани с образованием остеобластов и остеоцитов [Dominici et al., 2004]. Способность к дифференцировке в остеогенные клетки при трансплантации облученным мышам была показана и для побочной популяции (side population, SP) костного мозга, идентифицируемой по способности к выбросу ДНК-связывающих красителей и восстановлению кроветворного компартмента [Olmsted-Davis et al., 2003]. Фибробластоподобные клетки, способные к кроветворной дифференцировке, могут быть выделены не только из стромы костного мозга, но также и из пуповинной или периферической крови. Для них характерны нахождение в покое и отсутствие CD34 [Huss, 2000]. Вероятно, в гистогенетическом ряду клетки с характеристиками общих стромально-кроветворных предшественников предшествуют некоммитированным МСК.

3.2.4. Плюрипотентные клетки

Помимо мультипотентных стволовых клеток, потенциал которых ограничен дифференцировкой в производные одного зародышевого листка, в тканях не только зародыша, но и половозрелого организма обнаружены немногочисленные плюрипотентные клетки, способные давать начало производным как мезодермы и мезенхимы, так и экто- и энтодермы.

Различными группами авторов были идентифицированы несколько популяций подобных клеток, возможно, частично перекрывающиеся.

Первыми были описаны так называемые мультипотентные взрослые родоначальные клетки (multipotent adult progenitor cells, MAPC), обнаруженные в зрелом костном мозге мыши, крысы и человека [Jiang et al., 2002 a; Schwartz et al., 2002], а также в мышцах и головном мозге [Jiang et al., 2002 b]. При культивировании *in vitro* они могут быть индуцированы к дифференцировке в эндотелий, глиальные и нейроноподобные клетки и гепатоциты. Широкий спектр потенций к дифференцировке эти клетки проявляют и в экспериментах *in vivo*. Так, при инъекции МАРС в бластоцисту их потомки выявляются в большинстве тканей и органов полученных животных, включая головной мозг, сетчатку, легкое, скелетную и сердечную мышечную ткань, кишечник, почку, селезенку, костный мозг и кожу, а трансплантация их необлученной мыши приводит к дифференцировке в кроветворные клетки, эпителий печени, легкого и кишечника [Jiang et al., 2002 a; Keene et al., 2003].

К МАРС близки по свойствам индуцибельные клетки, выделенные из зрелого костного мозга человека (marrow-isolated multilineage inducible cells, MIAMI). Они были получены путем культивирования в условиях, воспроизводящих естественное микроокружение примитивных стволовых клеток – на фибронектине при пониженном содержании кислорода [D'Ippolito et al., 2004]. В условиях *in vitro* продемонстрированы потенции этих клеток к дифференцировке в костную, хрящевую, жировую и нервную ткани, а также в клетки панкреатических островков.

Еще одна популяция плюрипотентных клеток, обозначенная авторами как мультипотентные взрослые стволовые клетки (multipotent adult stem cells, MASC), содержится в сердце, печени и костном мозге половозрелого организма [Beltrami et al., 2007]. В присутствии соответствующих индукторов клоны этих клеток дифференцируются *in vitro* в нейроны, мышцы, эндотелий и гепатоциты.

Устойчивые к стрессу клетки, дифференцирующиеся во множественных направлениях (multilineage-differentiating stress-enduring cells, Muse cells), которые могут быть выделены из стромы костного мозга или культуры фибробластов кожи человека [Kuroda et al., 2010], способны дифференцироваться *in vitro* в клетки с фенотипическими признаками эктодермальных, энтодермальных и мезодермальных производных, а при трансплантации иммунодефицитным мышам давать клетки эпидермиса, мышц и печени. При культивировании в виде суспензии в метилцеллюлозной среде они образуют трехмерные агрегаты, подобно эмбриональным стволовым клеткам, но, в отличие от них, менее активно пролиферируют и не образуют тератом *in vivo*.

Среди других плюрипотентных популяций, полученных из разных источников, следует упомянуть неограниченные соматические стволовые клетки (unrestricted somatic stem cells, USSC) пуповинной крови, дифференцирующиеся *in vitro* и *in vivo* в клетки кости, хряща, крови, сердечной мышцы, нервной системы и печени [Kögler et al., 2004], клоны стромальных клеток костного мозга человека, среди возможных направлений дифференцировки которых – образование эндотелия, нервной ткани и клеток энтодермального происхождения [Yoon et al., 2005; Anjos-Afonso, Bonnet, 2007], стволовые клетки из скелетных мышц крысы, под влиянием дексаметазона дающие начало остеобластам, хондробластам, адипоцитам, эндотелию, гладким, скелетным и сердечным мышцам, нейронам, олигодендроцитам и гепатоцитам [Schultz et al., 2006] и, по-видимому, родоначальные клетки из печени плода человека, дифференцирующиеся на клональном уровне не только в гепатоциты и клетки желчных протоков, но и в мезенхимные производные – кость, жировую ткань, хрящ и эндотелий, хотя дифференцировка в эктодермальном направлении для них показана не была [Dan et al., 2006].

Несколько особняком стоят очень мелкие эмбрионально-подобные стволовые клетки (very small embryonic-like stem cells, VSELs) из костного мозга и других органов, способные дифференцироваться в нейральные, панкреатические клетки, кардиомиоциты и кроветворные предшественники, а также в клетки с фенотипом остеобластов и адипоцитов. Они отличаются от других плюрипотентных популяций очень малым размером (2-4 мкм в диаметре) и неадгезивностью и предположительно представляют собой мобильный пул примитивных стволовых клеток [Kucia et al., 2007; Zuba-Surma et al., 2009; Домарацкая, 2011]. Впрочем, результаты некоторых недавних исследований заставляют усомниться в плюрипотентном статусе VSELs. Так, сообщалось, что VSELs, выделенные из пуповинной крови человека, не соответствуют по иммунофенотипу и транскрипционному профилю ни эмбриональным, ни тканеспецифическим стволовым клеткам, не пролиферируют *in vitro* и часто имеют аберрантный кариотип [Danova-Alt et al., 2012], а полученные из костного мозга мыши - представляют собой гетерогенную популяцию, лишенную кроветворного потенциала и обогащенную клетками на ранних стадиях апоптоза [Szade et al., 2013].

Общим свойством остальных перечисленных клеточных популяций является, помимо способности к дифференцировке в производные трех зародышевых листков, значительный пролиферативный потенциал, свидетельствующий о высокой (возможно, неограниченной) способности к самоподдержанию. Число удвоений популяции, проходимых клетками *in vitro*, оценивается как более 40 для MASC [Beltrami et al., 2007] и USSC [Kögler et al., 2004], более 50 для MIAMI [D'Ippolito et al., 2004], от 70-80 до более 120 для MAPC [Jiang et al., 2002 a], не менее 100 для клеток из печени плода человека [Dan et al., 2006], более 140 для плюрипотентных клонов стромальных клеток костного мозга [Yoon et al., 2005]. Во многих случаях показано присутствие в плюрипотентных клетках активной теломеразы, что позволяет им длительно пролиферировать без потери потенций [D'Ippolito et al., 2005; Yoon et al., 2005;

Beltrami et al., 2007; Kucia et al., 2007]. Для большинства типов плюрипотентных клеток характерна экспрессия маркеров, свойственных эмбриональным стволовым клеткам – Oct-4, Rex-1, SSEA-1 или SSEA-3, nanog, Sox2 [Jiang et al., 2002 a; D'Ippolito et al., 2004; Anjos-Afonso, Bonnet, 2007; Beltrami et al., 2007; Kucia et al., 2007; Kuroda et al., 2010]. Однако есть и исключения: так, Oct-4 отсутствует в одной из плюрипотентных популяций клеток костного мозга человека [Yoon et al., 2005] и, по некоторым данным, в попуяции VSELs костного мозга мыши [Szade et al., 2013], а в стволовых клетках из скелетных мышц крысы не выявлены маркеры SSEA-1 и SSEA-3 [Schultz et al., 2006]. Существуют и другие фенотипические различия между популяциями плюрипотентных клеток. В частности, маркеры МСК СD90 и CD105 на высоком уровне экспрессируются MASC [Beltrami et al., 2007] и USSC [Kögler et al., 2004], но отсутствуют на VSELs [Kucia et al., 2007]; CD117 (c-kit) присутствует на поверхности плюрипотентных клеток костного мозга [Yoon et al., 2005] и зародышевой печени [Dan et al., 2006], но не USSC [Kögler et al., 2004] или VSELs [Домарацкая, 2011]; на клетках MIAMI выявляется антиген CD10, отсутствующий на MAPC [D'Ippolito et al., 2004]. Гистогенетические связи между различными популяциями плюрипотентных клеток остаются не выясненными; возможно, внутри этого компартмента существует своя иерархия, однако исследование данного вопроса затруднено неодинаковыми условиями ИХ выделения И культивирования, применяемыми различными авторами.

Предполагается, что плюрипотентные клетки в различных органах развивающегося и половозрелого организма являются недифференцированными потомками клеток эпибласта, сохраняющимися на протяжении постнатального онтогенеза и, возможно, представляющими собой резерв для регенерации тканей [Kucia et al., 2006, 2007; Домарацкая, 2011].

4. Локализация и функции МСК в организме

4.1. Локализация МСК

4.1.1. Источники МСК в развивающемся и зрелом организме

Согласно общепринятым представлениям, в эмбриогенезе МСК происходят из мезодермы. Однако имеются данные, что наиболее ранняя генерация МСК имеет нейроэпителиальное происхождение. У зародыша мыши на стадии 9,5 сут развития их источником являются клетки, экспрессирующие нейроэпителиальный маркер Sox1, дифференцировка которых в МСК частично происходит через стадию нервного гребня. На более поздних стадиях развития (14,5 сут у мыши) появляются МСК и другого,

предположительно мезодермального происхождения, в постнатальном онтогенезе практически полностью замещающие МСК из нейроэпителиального источника [Takashima et al., 2007]. Вопрос о том, возникают они в различных тканях параллельно и независимо или имеют общий источник, окончательно не решен, однако результаты сравнения профиля экспрессии генов в МСК различных органов мыши – в частности, неодинаковый характер экспрессии Нох-генов, определяющих топографическую идентичность данной клеточной популяции – позволяют предположить, что предшественники МСК различной анатомической локализации образуются в постсегментационной мезодерме [Sági et al., 2012].

Одним из первых мест появления МСК в ходе эмбриогенеза является аорто-гонадомезонефральная область. У зародыша мыши клетки, способные к остео-, адипо- и хондрогенезу, появляются ней уже на 11-е сутки эмбриогенеза, тогда как в других тканях и органах (желточном мешке, голове, сомитах, почках конечности, сердце, печени) они на этом сроке отсутствуют [Mendes et al., 2005]. На более поздних стадиях развития МСК обнаруживаются во всех органах гемопоэза – желточном мешке, печени, селезенке, костном мозге [Mendes et al., 2005; Wang et al., 2008; Wenceslau et al., 2011]. Их содержание в этих органах коррелирует с активностью кроветворения [Van Den Heuvel et al., 1987; Wolf et al., 1995], что может отражать ключевую роль МСК в организации кроветворного микроокружения. При этом в кроветворных органах плодов, в отличие от половозрелых животных, клоногенные МСК активно пролиферируют, и процентное содержание КОЕ-Ф в фазе синтеза ДНК также коррелирует с кроветворной активностью [Versele et al., 1987].

Однако локализация МСК в организме зародыша не ограничена органами гемопоэза. Они также присутствуют в надкостнице [Ghilzon et al., 1999], хрящевых закладках костей [Mirmalek-Sani et al., 2006], дерме кожи и мышечных фасциях [Covas et al., 2008], сердце [Srikanth et al., 2013], легком [in't Anker et al., 2003; Bernardo et al., 2007], почке [Lai et al., 2010 а], поджелудочной железе [Hu et al., 2003], семеннике [Covas et al., 2008]. Среди пренатальных и перинатальных источников МСК особый интерес исследователей вызывает плацента в связи с ее доступностью для клинического применения [Fauza, 2004; Fukuchi et al., 2004; Igura et al., 2004; Yen et al., 2005]. МСК со сходным фенотипом и сопоставимо высокой способностью к экспансии найдены как в материнской, так и в плодной ее частях [in't Anker et al., 2004]. МСК содержатся также в амниотической жидкости [in't Anker et al., 2004], вартоновом студне пуповины [Wang et al., 2004 a] и стенке пупочной вены [Romanov et al., 2003; Kim et al., 2004; Panepucci et al., 2004]. Как было неоднократно показано, МСК плодов и новорожденных отличаются от таковых половозрелого организма более высокими скоростью роста, теломеразной активностью и пролиферативным потенциалом [Götherström et al., 2003; in't Anker et al., 2004; Kern et al., 2006; Guillot et al., 2007; Zhang et al., 2009].

В постнатальном онтогенезе МСК присутствуют в большинстве органов и тканей. Как уже было сказано, впервые клоногенные стромальные предшественники (КОЕ-Ф) были выделены из зрелых костного мозга, селезенки и тимуса [Фриденштейн и др., 1970; Горская и др., 1976; Friedenstein et al., 1976]; последующий анализ фенотипа и потенций этих клеток подтвердил их принадлежность к MCK [da Silva Meirelles et al., 2006; Hegyi et al., 2010]. В значительном количестве МСК содержатся в скелетных и других мезенхимных тканях, предшественниками зрелых клеток которых они являются. Они найдены в трабекулярной кости [Noth et al., 2002], надкостнице [Nathan et al., 2003; Yoshimura et al., 2007], хрящевой ткани [Peng et al., 2008], суставной сумке [De Bari et al., 2001; Yokoyama et al., 2005; Yoshimura et al., 2007], сухожилиях [Tan et al., 2012], связках [Gay et al., 2007; Zhang et al., 2012 a], коже [Riekstina et al., 2009], зубной пульпе [Laino et al., 2006; Papaccio et al., 2006; Graciano et al., 2008]. Одним из наиболее перспективных с точки зрения регенеративной медицины источником МСК в зрелом организме является стромально-сосудистая фракция жировой ткани. Ее клетки обладают достаточно высоким пролиферативным потенциалом, способны к остеогенезу, адипогенезу, хондрогенезу и миогенезу [Nathan et al., 2003; De Ugarte et al., 2003; Guilak et al., 2006; Kern et al., 2006; Nakagami et al., 2006; Peng et al., 2008]; сообщалось также об их дифференцировке в клетки нервной ткани [Guilak et al., 2006; Krampera et al., 2007 a; Nakagami et al., 2006] и гепатоциты [Talens-Visconti et al., 2007]. При этом содержание МСК в жировой ткани значительно превосходит таковое в костном мозге [Kern et al., 2006; Yoshimura et al., 2007], и они могут быть получены посредством малоинвазивной процедуры. Кроме того, клетки с характеристиками МСК обнаружены в скелетных мышцах [Seruya et al., 2004; Yoshimura et al., 2007], сердце [Hoogduijn et al., 2007; Riekstina et al., 2009], легких [Sabatini et al., 2005; da Silva Meirelles et al., 2006], обонятельной выстилке [Diaz-Solano et al., 2012], почке [da Silva Meirelles et al., 2006; Huang et al., 2010], поджелудочной железе [da Silva Meirelles et al., 2006], кишечнике [Signore et al., 2012], матке [Земелько и др., 2011], нервной системе [da Silva Meirelles et al., 2006; Soleimani et al., 2008].

По основным характеристикам – морфологии, иммунофенотипу, профилю экспрессии генов, характеру роста *in vitro* и набору возможных дифференцировок - МСК из различных источников в целом сходны между собой [Fukuchi et al., 2004; Panepucci et al., 2004; Sabatini et al., 2005; Kern et al., 2006; Liu et al., 2006; da Silva Meirelles et al., 2006; Hoogduijn et al., 2007], однако их сравнительный анализ выявляет и некоторые различия, касающиеся экспрессии тех или иных маркеров, а также выраженности потенций к дифференцировке. Например, для популяции МСК из жировой ткани характерна меньшая по сравнению с МСК костного мозга доля клеток, несущих на своей поверхности VCAM-1 и некоторые другие молекулы адгезии [Wagner et al., 2007], более высокая способность к адипогенезу [Yoshimura et al., 2007;

Vishnubalaji et al., 2012] и, по некоторым данным, более низкая – к остеогенезу [Vishnubalaji et al., 2012], хотя другие авторы сообщают о равноценности остеогенных потенций клеток из этих источников [Hattori et al., 2004]. Слабые по сравнению с таковыми клеток костного мозга потенции к остеогенезу характерны также для МСК из тимуса [Hegyi et al., 2010]. МСК из легких плода человека уступают клеткам как зародышевого, так и зрелого костного мозга по хондрогенным потенциям [Bernardo et al., 2007], тогда как стромальные клетки вартонова студня пуповины, в отличие от костномозговых, экспрессируют хрящевые маркеры не только под влиянием индукторов, но и спонтанно [Wang et al., 2004 a]. МСК, содержащиеся в толстом кишечнике, при сходных с костномозговыми наборе поверхностных антигенов, способности к остеогенезу, поддержанию кроветворения и иммуномодуляции, отличаются от них меньшим пролиферативным потенциалом, слабостью хондрогенных потенций и полным отсутствием адипогенных, что может свидетельствовать о принадлежности их к компартменту коммитированных предшественников [Signore et al., 2012]. МСК из различных органов характеризуются неодинаковым профилем экспрессии ЩФ и маркеров плюрипотентности Oct4, Nanog, SSEA-4 [Riekstina et al., 2009], а также Нох-генов и ряда других транскрипционных факторов [Sági et al., 2012].

Широкая распространенность МСК в различных тканях организма, а также данные об их присутствии в стенке артерий, вен и микрососудов [Abedin et al., 2004; da Silva Meirelles et al., 2006; Covas et al., 2008; Hegyi et al., 2010; Sági et al., 2012] послужили основанием для предположения об идентичности МСК перицитам и/или адвентициальным клеткам [da Silva Meirelles et al., 2006; Caplan, 2008; Corselli et al., 2010; Oh, 2010]. Действительно, перициты близки к МСК по профилю экспрессии генов, имеют общие с ними маркеры (в частности, CD73, CD90, CD105, CD44 и CD146) и могут быть индуцированы к остео-, адипо- и хондрогенезу [Wieczorek et al., 2003; Covas et al., 2008; Corselli et al., 2010]. Адвентициальные ретикулярные клетки также идентичны МСК по ряду фенотипических маркеров [Jones, McGonagle, 2008]. В то же время, очевидно, не все периваскулярные клетки обладают характеристиками МСК: среди них встречаются и клетки с признаками дифференцировки в миогенном направлении, утратившие мультипотентность [Caplan, 2008].

В качестве другого возможного эквивалента МСК *in vivo* рассматриваются фибробласты. Их роднят с МСК такие свойства, как адгезивность к пластику, экспрессия основных поверхностных маркеров, продукция цитокинов; фибробласты многих тканей обладают также и свойственными МСК потенциями к дифференцировке в ткани мезенхимного происхождения [French et al., 2004; Covas et al., 2008; Haniffa et al., 2009; Linder et al., 2010; Halfon et al., 2011]. Однако, как показал сравнительный анализ характеристик МСК, фибробластов и перицитов, выделенных из нескольких источников, при всём сходстве с фибробластами по морфологии, фенотипу и возможным направлениям дифференцировки, МСК по профилю экспрессии генов наиболее близки к перицитам, тогда как фибробласты представляют собой более дифференцированные клетки с ограниченными потенциями [Covas et al., 2008].

В ходе онтогенеза содержание МСК в тканях изменяется. Так, в костном мозге в начальный период постнатальной жизни оно возрастает параллельно с числом кроветворных клеток, однако в дальнейшем эффективность клонирования МСК снижается [Brockbank et al., 1983; Wolf et al., 1995; Лебединская и др., 2004]. У старых мышей содержание клоногенных стромальных клеток в костном мозге снижено на 50% по сравнению с молодыми [Friedenstein et al., 1999]. Еще более выражено возрастное снижение численности КОЕ-Ф в селезенке и особенно в тимусе [Brockbank et al., 1983; Friedenstein et al., 1999; Лебединская и др., 2005].

Данные об изменениях свойств МСК при старении организма неоднозначны. С одной стороны, сообщалось о том, что клетки от старых крыс характеризуются меньшей скоростью роста, сниженным уровнем теломеразной активности, меньшей продукцией факторов роста и способностью к остео-, адипо- и хондрогенезу по сравнению с полученными от молодых животных [Zheng et al., 2007; Asumda, Chase, 2011]; возрастное снижение способности МСК к пролиферации и дифференцировке отмечено также и у человека [D'Ippolito et al., 1999; Zhang et al., 2012 a]. С другой стороны, есть данные о независимости скорости роста и потенций МСК от возраста крысы [Bellows et al., 2003; Tokalov et al., 2007] или человека [Justesen et al., 2002; Stenderup et al., 2003; Roura et al., 2006]. Однако различия между МСК, выделенными на разных стадиях постнатального онтогенеза, выявляются при их длительном культивировании *in vitro*: в этих условиях МСК от старых доноров быстрее прекращают рост [Stenderup et al., 2003] или теряют потенции к дифференцировке [Bellows et al., 2003], что может свидетельствовать об их меньшей способности к самоподдержанию по сравнению с клетками молодого организма.

4.1.2. Микроокружение МСК

МСК в тканях существуют в определенном микроокружении, оказывающем регуляторное влияние на различные аспекты их жизнедеятельности. Еще в 70-ых годах применительно к кроветворной системе было сформулировано понятие ниши как совокупности локальных условий, поддерживающих стволовую клетку в недифференцированном состоянии [Schofield, 1978]. В дальнейшем концепция ниши как микроокружения, обеспечивающего самоподдержание стволовой клетки и контролирующего ее поведение, была расширена и на другие системы со стволовыми и родоначальными клетками, включая и MCK [Kolf et al., 2007; Benayahu et al., 2007; Kuhn, Tuan, 2009]. С учетом вышеописанной гипотезы о МСК как компонентах сосудистой стенки, анатомически их тканевую нишу можно охарактеризовать в первую очередь как периваскулярную. Однако эта локализация, очевидно, не является единственно возможной для МСК. Так, они присутствуют в хрящевой ткани, не имеющей кровеносных сосудов [Mirmalek-Sani et al., 2006; Peng et al., 2008], а в костном мозге, помимо периваскулярной ниши МСК, существует и эндостальная [Jones, McGonagle, 2008], причем стромальные клетки в ней имеют фенотипические отличия от локализованных периваскулярно, а именно не экспрессируют общий для МСК и перицитов маркер CD146 [Tormin et al., 2011].

Основными компонентами ниши являются окружающие клетки, вырабатываемые ими и самими стволовыми клетками растворимые молекулы и внеклеточный матрикс. МСК в нише тесно контактируют с соседними клетками различных типов; в частности, в костном мозге они соседствуют с остеобластами, остеокластами, фибробластами, адипоцитами, эндотелиальными, кроветворными и иммунными клетками, которые могут оказывать на них регуляторное влияние путем непосредственного взаимодействия через мембранные молекулы или продукции гуморальных факторов. Показано, например, что для выживания и пролиферации КОЕ-Ф костного мозга при культивировании с низкой плотностью или в бессывороточной среде требуются не вполне охарактеризованные факторы, секретируемые кроветоворными клетками [Friedenstein et al., 1992; Baksh et al., 2005]. Моноциты и макрофаги при взаимодействии с MCK могут стимулировать их дифференцировку в остеогенном направлении путем продукции онкостатина М [Nicolaidou et al., 2012]; стимуляция пролиферации и костной дифференцировки МСК отмечена также под влиянием факторов, выделяемых остеоцитами [Heino et al., 2004]. Гуморальные регуляторы, воздействующие на МСК в нише, могут продуцироваться не только окружающими клетками, но и аутокринно самими МСК. К таким факторам, выделяемым стромальными клетками и влияющими на их самоподдержание и/или рост, относятся, в частности, ИЛ-1, ИЛ-6 [Yan et al., 1990; Rodriguez Mdel et al., 2004], bFGF [Kinnard et al., 2004], TNFα, LIF, SCF [Haynesworth et al., 1996; Wallace et al., 2001].

Не менее важны для МСК и их контактные взаимодействия как с соседними клетками, так и друг с другом. Известно, что в определенных условиях культивирования МСК образуют неадгезивные сфероиды («мезенсферы»), самоподдерживающиеся при серийных трансплантациях и сохраняющие потенции к дифференцировке *in vitro* [Mendez-Ferrer et al., 2010; Baraniak, McDevitt, 2012]. Трехмерные кластеры образуют в суспензионной культуре и плюрипотентные Muse-клетки – вероятные предшественники МСК. В этих кластерах они поддерживаются в недифференцрованном состоянии и прекращают пролиферацию по достижении определенной величины агрегата, однако возобновляют активный рост при переносе в адгезивную культуру [Kuroda et al., 2010]. Возможно, контактные взаимодействия

между клетками в составе подобных структур способствуют сохранению пролиферативного и дифференцировочного потенциала примитивных МСК. Контакты с соседними дифференцированными клетками тоже могут быть влиять на судьбу МСК. Показано, например, что совместное культивирование с эндотелием приводит к усилению экспрессии в них αгладкомышечного актина и дезорганизации актинового цитоскелета, а при контакте с фибробластами дермы МСК приобретают признаки миофибробластоподобных клеток с организованными актиновыми филаментами [Ball et al., 2004].

Межклеточные взаимодействия в микроокружении МСК опосредуются в первую очередь кадгеринами – трансмембранными молекулами, способными взаимодействовать с белками Wnt и регулирующими межклеточную адгезию, миграцию и дифференцировку [Kolf et al., 2007]. Регуляторная роль кадгеринов подтверждается изменением уровня их экспрессии в ходе дифференцировки МСК в различных направлениях. Так, индукция остеогенеза сопровождается усилением экспрессии кадгерина-11 и снижением экспрессии R-кадгерина, адипогенез ассоциирован с ослаблением экспрессии кадгерина-11 и N-кадгерина [Shin et al., 2000], а хондрогенез – с изменениями в экспрессии генов кадгеринов 4 и 13 [Djouad et al., 2007] и N-кадгерина, антитела к которому в значительной мере подавляют образование клеточных узелков [Li, Xu, 2005].

Внеклеточный матрикс представляет собой сложно организованную трехмерную сеть макромолекул, которая не только механически поддерживает клетки, но и модулирует различные биологические процессы, связанные с их миграцией, пролиферацией и дифференцировкой. В состав матрикса, окружающего стромальные клетки костного мозга, входят белки, гликозаминогликаны и протеогликаны, синтезируемые МСК и окружающими клетками, в частности, эндотелием - коллагены I, III и IV типов, фибронектин, ламинин, синдекан, перлекан, бигликан, декорин. Из гликозаминогликанов в нем выявлены хондроитини гепарансульфаты и гиалуроновая кислота, преобладает гепарансульфат [Gordon, 1988; Chen et al., 2007; Lai et al., 2010 b]. Сходный состав имеет внеклеточный матрикс и в других тканях, содержащих МСК; так, в печени зародыша основными его компонентами являются те же молекулы, что и в костном мозге - коллагены I и IV типов, фибронектин, ламинин, протеогликаны [Amenta, Harrison, 1997]. Очевидно, взаимодействия МСК с матриксом обеспечивают поддержание их в нише в недифференцированном состоянии. Во всяком случае, было неоднократно показано, что МСК, культивируемые на внеклеточном матриксе того или иного происхождения, дольше сохраняют пролиферативный и дифференцировочный потенциал, чем при культивировании на пластике, и не подвергаются при этом спонтанной дифференцировке [Matsubara et al., 2004; Chen et al., 2007; Lai et al., 2010 b; Antoon et al., 2012].

В то же время при индукции дифференцировки МСК наблюдаются определенные изменения в составе их внеклеточного матрикса [Kubo et al., 2000; Djouad et al., 2007].

Взаимодействие МСК с компонентами внеклеточного матрикса происходит главным образом через интегрины, связывание которых с RGD-последовательностью в составе матриксных белков запускает сигнальные пути, регулирующие выживание, миграцию, пролиферацию и дифференцировку клеток [Docheva et al., 2007]. В частности, показано, что нарушение взаимодействия МСК с коллагеном I типа, опосредованного интегринами $\alpha 2\beta 1$ и $\alpha 11\beta 1$, ведет к гибели клеток [Popov et al., 2011], а блокирование цепи интегрина $\beta 1 - \kappa$ подавлению остеогенеза в индукционной среде [Gronthos et al., 2001 b]. В регуляции адгезии, миграции, роста и дифференцировки МСК задействованы и другие механизмы взаимодействия клеток с матриксом – в частности, через CD44, связывающийся с гиалуроновой кислотой [Zhu et al., 2006; Chung, Burdick, 2009; Yang et al., 2010]. Известно также, что гликозаминогликаны внеклеточного матрикса связывают bFGF и другие факторы роста, оказывающие регуляторное влияние на MCK [Vlodavsky et al., 1991].

Важной особенностью тканевого микроокружения МСК является низкое парциальное давление кислорода. Есть данные, что гипоксические условия способствуют повышению клоногенной способности и пролиферативной активности МСК и замедлению их дифференцировки в остеогенном и адипогенном направлениях, а также усилению экспрессии генов Oct-4, Rex-1, Sox2, Nanog и SSEA-4, то есть могут обусловливать поддержание недифференцированного статуса МСК. Предполагается, что механизм влияния пониженного содержания кислорода на МСК связан с активацией транскрипционного фактора HIF (фактор, индуцируемый гипоксией), изменяющего экспрессию многих генов [Kolf et al., 2007; Панюхин и др., 2008; Буравкова и др., 2012].

В целом роль различных компонентов ниши МСК в контроле их функционирования *in vivo* остается недостаточно изученной, что делает актуальной разработку трехмерных культуральных систем, позволяющих с максимальной полнотой реконструировать *in vitro* весь комплекс условий их естественного микроокружения [Lund et al., 2009].

4.1.3. Миграция МСК

Вероятно, в раннем онтогенезе МСК мигрируют по организму, заселяя различные ткани. В частности, характер изменения численности КОЕ-Ф в транзиторных органах гемопоэза на разных стадиях индивидуального развития может быть косвенным свидетельством того, что процесс последовательной смены локализации кроветворения включает перемещение не только кроветворных, но и стромальных предшественников. Так, в ходе развития мыши высокое число КОЕ-Ф в печени, селезенке и костном мозге предшествует максимальному содержанию СКК в этих органах. В печени число КОЕ-Ф падает с началом кроветворения в селезенке, а затем восстанавливается; то же происходит в селезенке с началом кроветворения в костном мозге [Van Den Heuvel et al., 1987]. Причина подобных изменений численности клоногенных МСК может состоять в их последовательном переселении из одного органа в другой, где они подготавливают микроокружение для приходящих следом кроветворных клеток. При этом источником заселения печени зародыша предположительно являются МСК из аорто-гонадомезонефральной области, а не из желточного мешка, стромальные клетки которого существенно отличаются по своим характеристикам от других популяций МСК [Wang et al., 2008]. Прямые доказательства перемещения МСК при смене локализации кроветворения отсутствуют, однако возможность миграции этих клеток на ранних стадиях развития организма подтверждается их присутствием в крови плодов человека, крысы и мыши [Campagnoli et al., 2001; Naruse et al., 2004; Mendes et al., 2005] и пуповинной крови человека [Zhou et al., 2003; Bieback et al., 2004; Kern et al., 2006; Sudo et al., 2007; Wagner et al., 2007].

В периферической крови половозрелого организма МСК в норме малочисленны или отсутствуют [Lazarus et al., 1997; Wexler et al., 2003; Koerner et al., 2006; Heino et al., 2012]. Однако их содержание в крови значительно повышается в патологических условиях, сопровождающихся повреждением тканей – в частности, при хронической гипоксии [Rochefort et al., 2006], ожогах кожи [Mansilla et al., 2006], повреждении скелетных мышц [Ramirez et al., 2006], тяжелой сердечно-легочной недостаточности [Bui et al., 2010]. Очевидно, в этих случаях МСК выходят в кровоток и мигрируют в место повреждения для участия в регенерации.

Способность МСК к направленной миграции (хомингу) в места повреждения была неоднократно показана в экспериментах по их системному введению животным с различными патологиями [Chapel et al., 2003; Kraitchman et al., 2005; Rojas et al., 2005; Hu et al., 2013]. Направленная миграция МСК происходит также в опухоли, следствием роста и инвазии которых являются локальные повреждения тканей и активация механизмов репарации [Dwyer et al., 2007; Kuhn, Tuan, 2009; Hass, Otte, 2012]. Стимулами, привлекающими МСК в поврежденные участки, служат выделяемые воспаленными тканями хемокины и цитокины, взаимодействующие с рецепторами на поверхности МСК [Chamberlain et al., 2007; Salem, Thiemermann, 2010; Baglio et al., 2012]. Наиболее важную роль в хоминге МСК играет их взаимодействие через поверхностный рецептор СХСR4 с хемокином SDF-1, известным также как СХСL12 [Zhuang et al., 2009; Xu et al., 2010; Hu et al., 2013]. Помимо SDF-1, известны и другие хемотактические стимулы для МСК. Так, их миграция в опухоли направляется МСР-1, секретируемым опухолевыми клетками [Dwyer et al., 2007; Xu et al., 2007], а кератиноциты

кожных ран выделяют хемокин CCL21, специфически взаимодействующий с рецептором CCR7 на поверхности MCK [Sasaki et al., 2008].

Миграция МСК в поврежденную ткань через кровоток предполагает их прохождение через стенку кровеносного сосуда. Его механизмы сходны с таковыми при выходе в ткани лейкоцитов: первоначальное слабое взаимодействие с эндотелием, опосредуемое селектинами, сменяется более прочной адгезией через интегрины (в частности, связыванием интегрина α4β1 на поверхности циркулирующей клетки с VCAM-1 на эндотелии), за которым следует проникновение сквозь эндотелий и, наконец, миграция через внеклеточный матрикс с помощью деградирующих его металлопротеиназ [Chamberlain et al., 2007; Salem, Thiemermann, 2010; Baglio et al., 2012; Teo et al., 2012]. Однако, помимо общих с лейкоцитами механизмов диапедеза, МСК используют и иные, еще недостаточно изученные. Так, в отличие от лейкоцитов, трансэндотелиальная миграция МСК не предваряется значительной латеральной миграцией вдоль эндотелия и происходит существенно медленнее, а ее ранние стадии сопровождаются блеббингом плазмолеммы, вздутия которой, оказывая давление на подлежащий эндотелий, возможно, способствуют проходу клетки сквозь него [Teo et al., 2012].

Обсуждается также возможность миграции МСК в поврежденные участки без выхода в кровоток. Присутствие МСК в большинстве тканей организма, по-видимому, делает их перемещение на дальние расстояния через кровь необязательным для репарации небольших локальных дефектов; в этих случаях оказывается достаточной короткодистантная миграция МСК по сопровождающей сосуды соединительной ткани, чему способствует их периваскулярная локализация [Jones, McGonagle, 2008].

4.2. Роль МСК в регенерации

4.2.1. Дифференцировка МСК in vivo

Мигрируя в область повреждения по градиенту выделяющихся хемокинов, МСК под влиянием микроокружения поврежденной ткани могут дифференцироваться в необходимом направлении, замещая погибшие клетки. Такой механизм их участия в регенерации представляется наиболее важным при повреждении скелетных тканей. В экспериментах на животных показано, что МСК, трансплантированные в дефект костной и/или хрящевой ткани, способны обеспечивать его закрытие [Nathan et al., 2003; Kadowaki et al., 2004], причем в составе образущихся при этом тканей присутствуют клетки донорского происхождения [Oshima et al., 2005]. Согласно ряду сообщений, дифференцировка системно или локально введенных МСК в клетки поврежденной ткани наблюдается также при регенерации миокарда [Krupnick et al., 2004; Nagaya et al., 2004; Yoon et al., 2005], кожи [Altman et al., 2008; Sasaki et al., 2008], печени [Sato et al., 2005], почек [Morigi et al., 2004] и легких [Rojas et al., 2005]. Улучшению состояния пораженной ткани может способствовать дифференцировка МСК не только в клетки, ответственные за ее специфические функции, но также и также и в эндотелий и гладкие миоциты кровеносных сосудов, показанная, в частности, при инфаркте миокарда [Nagaya et al., 2004; Silva et al., 2005; Yoon et al., 2005] и кожных ранах [Altman et al., 2008; Sasaki et al., 2008].

Участие МСК в репарации может также состоять в их слиянии с клетками поврежденной ткани, в результате чего гибридная клетка, с одной стороны, сохраняет характерные признаки МСК, с другой - приобретает фенотип и генетическую программу дифференцированных клеток данной ткани. В частности, МСК, инъецированные в поврежденную кардиотоксином скелетную мышцу, сливаются с мышечными волокнами реципиента [Shi et al., 2004], а в мозжечке мышей с аутоиммунным энцефаломиелитом отмечено слияние внутривенно введенных МСК с клетками Пуркинье [Kemp et al., 2011]. При инъекции МСК в область инфаркта миокарда они сливаются с кардиомиоцитами, что, судя по результатам экспериментов *in vitro*, может защищать последние от апоптоза [Yang et al., 2012].

Однако во многих случаях терапевтический эффект трансплантации МСК зависит лишь от количества вводимых клеток, но не коррелирует с эффективностью их приживления, которая часто бывает крайне низкой [Phinney, Prockop, 2007]. Так, у пациентов с несовершенным остеогенезом (osteogenesis imperfecta) пересаженные МСК оказывали клинический эффект, хотя уровень их приживления в костной и других тканях составлял менее 1% [Horwitz et al., 1999]. Более того, спустя длительный срок после трансплантации донорские МСК могут уже не обнаруживаться в тканях реципиента [Noiseux et al., 2006; Iso et al., 2007; Ueno et al., 2013]. Ряд авторов сообщают, что улучшение сердечной функции у животных с инфарктом миокарда после инъекции МСК сопровождается кардиомиогенной дифференцировкой лишь немногих донорских клеток [Nakamura et al., 2007; Noiseux et al., 2006] или не сопровождается ею вообще [Schenk et al., 2007]. Редким событием является и слияние пересаженных МСК с кардиомиоцитами в области инфаркта [Noiseux et al., 2006]. Таким образом, в большинстве случаев репаративный эффект МСК обусловлен не столько дифференцировкой МСК (или их слиянием с дифференцированными клетками), сколько иными механизмами.

4.2.2. Трофическая активность

В настоящее время одной из важнейших функций МСК *in vivo* и основной причиной их благотворного влияния на регенерацию тканей считается так называемая трофическая активность – паракринная секреция широкого спектра биологически активных макромолекул,

воздействующих на эндогенные клетки и создающих в поврежденной ткани регенеративное микроокружение [Caplan, 2007; 2009; Phinney, Prockop, 2007; Oh, 2010]. Показано, что при ряде патологий терапевтическое действие на ткань может оказывать не только трансплантация МСК. но и введение кондиционированной среды, содержащей набор секретируемых ими факторов. В частности, среда, кондиционированная МСК, улучшает состояние экспериментальных животных с повреждением легких [Curley et al., 2012], хроническим заболеванием почек [van Корреп et al., 2012], травмой головного мозга [Chang et al., 2013 a], стимулирует регенерацию печени после частичной гепатэктомии [Fouraschen et al., 2013]. В последнее время появились данные, о том, что паракринные эффекты МСК могут быть опосредованы секрецией ими не только растворимых цитокинов и факторов роста, но и микровезикул, содержащих еще недостаточно охарактеризованный набор белков и РНК. Окружающие клетки могут поглощать микровезикулы, высвобождаемые МСК, и таким образом получать от них регуляторные молекулы [Baglio et al., 2012]. Инъекции этих микровезикул оказывают защитное действие на животных с инфарктом миокарда [Lai et al., 2010 a] и повреждением почек [Gatti et al., 2011; Bruno et al., 2012]. Роль высвобождаемых МСК микрочастиц в репаративных процессах подтвержается также наблюдением их мобилизации в кровь пациентов с инсультом, причем количество циркулирующих микрочастиц коррелирует с тяжестью инсульта [Kim et al., 2012 b].

Факторы, выделяемые МСК, способствуют выживанию клеток [Lou et al., 2003; Yoon et al., 2005; Iso et al., 2007], стимулируют их пролиферацию [Kinnaird et al., 2004; Yoon et al., 2005; Gatti et al., 2011; Fouraschen et al., 2012], подавляют воспалительные реакции [Rojas et al., 2005; van Buul et al., 2012; Curley et al., 2012; Fouraschen et al., 2012; Ueno et al., 2013], препятствуют развитию фиброза [Mias et al., 2009; Ueno et al., 2013]. Важное значение в регенерации имеет формирование в поврежденной области кровеносных сосудов, способствующее улучшению кровоснабжения. Роль МСК в этом процессе состоит не только в дифференцировке в компоненты сосудистой стенки, но и в продукции ангиогенных цитокинов - в частности, VEGF и bFGF [Kinnaird et al., 2004; Nakagami et al., 2006; Peng et al., 2008; Boomsma, Geenen, 2012; Fouraschen et al., 2012]. Усиленной продукции этих и других паракринных факторов способствует гипоксия, характерная для ишемизированных тканей [Iso et al., 2007; Li et al., 2010; Chang et al., 2013 a].

Кроме того, МСК обладают иммуносупрессивными свойствами и могут модулировать межлимфоцитарные взаимодействия. *In vivo* аллогенные МСК не только не отторгаются иммунной системой, но и подавляют отторжение аллогенных трансплантатов [LeBlanc, 2003; Keating, 2006]. *In vitro* они не индуцируют пролиферации аллогенных лимфоцитов и не подвергаются лизису цитотоксическими Т-клетками и естественными киллерами [Татаринова и др., 2009]. Гипоиммуногенность МСК обеспечивается отсутствием на их поверхности

антигенов главного комплекса гистосовместимости класса II и костимулирующих лигандов, необходимых для активации CD4⁺-Т-лимфоцитов [Маянская и др., 2013]. Согласно большинству сообщений, МСК ингибируют пролиферацию Т- и В- лимфоцитов в ответ на аллоантигены и неспецифические митогены [Götherström et al., 2003; Sun et al., 2003; Rasmusson et al., 2005; Владимирская, 2007; Wang et al., 2008; Moreno et al., 2010; Baglio et al., 2012] и способны активировать Т-лимфоциты супрессорного фенотипа [Владимирская, 2007]. Помимо прямого влияния на лимфоциты, МСК подавляют их активацию и опосредованно, воздействуя на антигенпрезентирующие клетки. В частности, они ингибируют дифференцировку последних, экспрессию снижают секрецию ИМИ цитокинов, антигенов главного комплекса гистосовместимости класса II и способность стимулировать Т-клетки в смешанной культуре лейкоцитов [Владимирская, 2007; Huang et al., 2010]. Есть данные, что иммуносупрессорные свойства МСК активируются под влиянием стимуляции воспалительными цитокинами – в частности, интерфероном-γ, TNF-α, ИЛ-1-β [Рубцов и др., 2012]. Однако иммуномодулирующие функции МСК не сводятся только к супрессивным эффектам. В некоторых случаях они способны индуцировать пролиферацию сокультивируемых с ними аллогенных лимфоцитов [Moreno et al., 2010], выступать в роли антигенпрезентирующих клеток, стимулируя пролиферацию Т-лимфоцитов в ответ на антиген [Mayumdar et al., 2003] и активировать продукцию антител В-клетками [Татаринова и др., 2009]. По некоторым данным, влияние МСК на иммунную систему зависит от их соотношения с лимфоцитами: в больших количествах они подавляют пролиферацию лимфоцитов и продукцию антител, а в малых – стимулируют [LeBlanc, 2003; Татаринова и др., 2009]. Способность МСК регулировать деятельность иммунной системы важна для предотвращения чрезмерного повреждения тканей в результате иммунного ответа при воспалительных и аутоиммунных процессах [Рубцов и др., 2012]. Кроме того, физиологическая роль иммуносупрессивных свойств МСК может состоять в поддержании периферической толерантности к собственным антигенам и гомеостаза стромального микроокружения кроветворных клеток в органах гемопоэза, а также обеспечении иммунопривилегированного положения плода при беременности [Маянская и др., 2013].

4.3. МСК кроветворных органов как клетки, организующие кроветворное микроокружение

Трофическая активность МСК проявляется не только при репарации тканей, но и в норме - при создании кроветворного микроокружения. СКК свободно циркулируют в периферической крови, однако пролиферируют и дифференцируются только в специализированных кроветворных органах, строма которых обеспечивает подходящие условия для этих процессов. О необходимости локальных регуляторных влияний со стороны окружающих клеток для поддержания гемопоэза свидетельствуют и результаты экспериментов *in vitro*. Хотя коммитированные кроветворные клетки могут дифференцироваться под влиянием цитокинов в полутвердых средах без стромы [Metcalf, 1989], длительное поддержание кроветворения возможно лишь в присутствии стромальных клеток. Так, в системе, разработанной Декстером [Dexter, 1979] и предполагающей культивирование костного мозга в виде тканевого фрагмента с последующей реинокуляцией образовавшегося адгезивного слоя взвесью костномозговых клеток, кроветворная дифференцировка продолжается в течение что подчеркивает особую важность стромальной нескольких месяцев, ниши ДЛЯ самоподдержания СКК. Ключевую роль в организации этой ниши играют локализованные в кроветворных органах МСК и их дифференцированные в различных направлениях потомки.

4.3.1. Стромальная регуляция гемопоэза

4.3.1.1. Клеточный состав кроветворной стромы

Строма органов гемопоэза состоит из различных клеточных популяций, каждая из которых вносит свой вклад в организацию кроветворного микроокружения. Несмотря на наличие общих компонентов, клеточный состав кроветворных ниш в различных органах имеет свои специфические особенности. Так, в костном мозге существует две физиологически различных ниши для СКК – эндостальная (остеобластическая), поддерживающая стволовые клетки в состоянии покоя, и васкулярная, регулирующая их пролиферацию, дифференцировку и выход в кровоток [Yin, Li, 2006; Ehninger, Trumpp, 2011; Psaila et al., 2012]. По-видимому, родоначальные кроветворные клетки, являющиеся потомками локализованных вблизи эндоста стволовых клеток, по мере дифференцировки и созревания мигрируют к кровеносным сосудам в центре костномозговой полости [Yin, Li, 2006].

В эндостальной нише кроветворные клетки находятся в тесном контакте с остеобластами и остеокластами. Известно, что остеобласты способны поддерживать пролиферацию ранних кроветворных клеток *in vitro* [Nelissen et al., 2000; Chitteti et al., 2010]. Наиболее важную роль в поддержании СКК играет определенная субпопуляция веретеновидных остеобластов, выстилающих эндостальную поверхность кости, а именно те из них, которые экспрессируют Nкадгерин (SNO-клетки). Морфологически отличные от них остеобласты овальной или кубической синтезирующие формы, активно костный матрикс И являющиеся непосредственными предшественниками остеоцитов, по-видимому, не вносят существенного вклада в организацию кроветворного микроокружения [Yin, Li, 2006; Askmyr et al., 2009;

Sugiyama, Nagasawa, 2012]. По некоторым данным, в регуляции гемопоэза эндостальной нишей участвуют и остеокласты, способные как удерживать СКК вблизи эндоста за счет высвобождения Ca^{2+} в процессе деградации костного матрикса, так и усиливать мобилизацию СКК [Psaila et al., 2012; Sugiyama, Nagasawa, 2012].

Васкулярную нишу составляют эндотелий синусоидных капилляров и периваскулярные стромальные клетки. Эндотелиальные клетки костного мозга способны поддерживать пролиферацию и дифференцировку кроветворных клеток [Möhle et al., 1997; Rafii et al., 1997], а также контролируют их хоминг и выход в циркуляцию [Jacobsen et al., 1996; Ponomaryov et al., 2000]. Среди стромальных клеток васкулярной ниши ключевая роль в регуляции гемопоэза принадлежит так называемым CAR-клеткам (CXCL12-abundant reticular cells) и клеткам, экспрессирующим нестин. Первые представляют собой отростчатые клетки, продуцирующие большое количество SDF-1; часть из них окружают синусоиды, колокализуясь с CKK, остальные равномерно рассеяны по костному мозгу. Они требуются как для самоподдержания CKK, так и для пролиферации эритроидных и В-клеток [Ehninger, Trumpp, 2011; Sugiyama, Nagasawa, 2012]. Периваскулярные клетки, экспрессирующие нестин, тесно ассоциированы с CKK и контактируют с симпатическими нервными волокнами, что может играть роль в регуляции гемопоэза. Удаление их из костного мозга снижает содержание и подавляет хоминг CKK [Mendes-Ferrer et al., 2010].

В организации кроветворного микроокружения участвуют и другие клетки костного мозга. Так, основу его стромы составляют ретикулярные клетки – гетерогенная популяция, являющаяся разновидностью фибробластов и, очевидно, включающая в себя в качестве минорных фракций CAR-клетки и клетки, экспрессирующие нестин. Фибробласты костного мозга создают кроветворным клеткам механическую опору, обеспечивают их адгезию, продуцируют цитокины и внеклеточный матрикс, являющийся важным компонентом кроветворного микроокружения [Yan et al., 1990; Jacobsen et al., 1996; Mayumdar et al., 1998; Ulyanova et al., 2005]. Предполагается, что в поддержании гемопоэза участвуют и миоидные (гладкомышечные) клетки костномозговой стромы [Sensebe et al., 1997]. Помимо продукции гуморальных регуляторов, благодаря своему контрактильному фенотипу они могут регулировать перемещение кроветворных клеток [Dennis, Charbord, 2002]. Адипоциты костного мозга рассматриваются скорее как негативные регуляторы гемопоэза [Naveiras et al., 2009], но известны линии преадипоцитов, поддерживающие миело- и лимфопоэз, в некоторых случаях – и после дифференцировки в адипоциты [Gimble et al., 1990; Hangoc et al., 1993; Okuyama et al., 1995]. Возможно, одной из функций адипоцитов в составе кроветворного микроокружения является продукция лептина, способного стимулировать гранулоцитарно-макрофагальную дифференцировку [Mikhail et al., 1997]. Наконец, в состав кроветворного микроокружения

костного мозга входят зрелые резидентные макрофаги, способные как продуцировать кроветворные цитокины [Quesenberry et al., 1990], так и подавлять гемопоэз *in vitro* [Goliaeri et al., 1992]. Центральные макрофаги эритробластических островков снабжают эритробласты железом, обеспечивают их энуклеацию и фагоцитируют выброшенные ядра [Chasis, Mohandas, 2008]. Кроме того, макрофаги способствуют удержанию СКК и родоначальных кроветворных клеток в нише, контролируя продукцию SDF-1 клетками стромы [Ehninger, Trumpp, 2011].

В печени зародыша, как и в костном мозге половозрелого организма, в регуляции гемопоэза участвуют эндотелий [Schweitzer et al., 1996; Ohneda et al., 1997; Rafii et al., 1997; Wittig et al., 2010], стромальные клетки с признаками гладкомышечной дифференцировки [Charbord et al., 2000; Dennis, Charbord, 2002] и макрофаги – как входящие в состав эритробластических островков [Li et al., 2004; Isern et al., 2008], так и Купферовы клетки, способные, по некоторым данным, секретировать эритропоэтин [Paul et al., 1984] и фагоцитировать ядра эритробластов [Lee et al., 1999]. По-видимому, вклад в организацию кроветворного микроокружения печени вносят и клетки фибробластического ряда – фибробласты и миофибробласты, локализованные преимущественно в области портальных триад [Tamiolakis et al., 2007]. Возможно, они эквивалентны ретикулярным клеткам, которые при электронно-микроскопическом исследовании зародышевой печени выявляются вокруг крупных сосудов в тесной ассоциации с гранулоцитами и мегакариоцитами [Emura et al., 1984].

Однако наряду с типами клеток, характерными также и для костномозговых ниш, кроветворное микроокружение развивающейся печени включает и ряд уникальных клеточных популяций. Так, гепатобласты и гепатоциты участвуют в регуляции эритропоэза [Eckardt, 1996; Sugiyama et al., 2011 b] и способны длительно поддерживать кроветворение *in vitro* [Nanno et al., 1994; Aiuti et al., 1998]. Ключевую роль в экспансии СКК в зародышевой печени мыши, повидимому, играет субпопуляция эпителиальных родоначальных клеток с фенотипом SCF⁺DLK⁺ [Chou, Lodish, 2010]. Пролиферацию кроветворных клеток способен поддерживать и эпителий желчных протоков [Lamy et al., 1997; Corlu et al., 1998]. Важный компонент кроветворного микроокружения зародышевой печени – клетки в состоянии эпителиомезенхимного перехода, многочисленные в фазу активного кроветворения и исчезающие в ходе затухания гемопоэза на поздних строках пренатального развития [Chagraoui et al., 2003; Li et al., 2011]. Клетки с подобным фенотипом, коэкспрессирующие маркеры мезенхимы и печеночного эпителия, способны поддерживать СКК в недифференцированном состоянии *in vitro* [Zhang et al., 2005 b]. Еще один тип клеток, рассматриваемый многими авторами как часть кроветворного микроокружения печени - клетки Ито, или звездчатые клетки печени, расположенные в перисинусоидальном пространстве Диссе и контактирующие с кроветворными клетками [Киясов и др., 1997; Nitou et al., 2000; Kordes et al., 2013].

Морфологический и и ультраструктурный анализ кроветворящей печени обнаруживает дифференцирующиеся гранулоциты в основном вокруг сосудов портальных триад и под капсулой, тогда как эритроидные клетки на ранних стадиях дифференцировки контактируют с гепатоцитами, а на более поздних окружают центральные макрофаги эритробластических островков [Emura et al., 1984; Timens, Kamps, 1997; Ayres-Silva et al., 2011]. Такая локализация кроветворных клеток может говорить о преимущественной роли стромальных механоцитов в регуляции гранулоцитарной дифференцировки, а клеток печеночной паренхимы – в поддержании эритропоэза. СКК в печени зародыша прилежат к синусоидной сети, и их самоподдержание требует взаимодействия с клетками синусоидов через определенные регуляторные молекулы, в частности, через активированный белок С [Iwasaki et al., 2010].

Морфологический субстрат кроветворного микроокружения других органов гемопоэза изучен слабее. Есть данные, что в поддержании кроветворения в желточном мешке участвуют клетки эндотелия и висцеральной энтодермы, контролирующие гемопоэз за счет секреции ангиопоэтина-1, распознаваемого рецепторами на примитивных эритроидных клетках [Sugiyama et al., 2011 a], и экспрессии генов сигнального пути Hedgehog [Sadlon et al., 2004], а в аорто-гонадо-мезонефральной области кроветворную нишу составляют мезенхимные клетки с фенотипом с-kit^{-/}/CD34⁻, влияние которых на экспансию СКК также опосредовано сигнальным путем Hedgehog, и эндотелиоциты [Sugiyama et al., 2011 a]. Эндотелий обоих органов не только регулирует пролиферацию и дифференцировку кроветворных клеток, но и связан с ними гистогенетически: в кровяных островках желточного мешка эндотелиальные и примитивные кроветворные клетки развиваются из общих предшественников – гемангиобластов, а в аорто-гонадо-мезонефральной области источником дефинитивных СКК служит гемогенный эндотелий [Sadlon et al., 2004]. Кроме того, в этих органах присутствуют и стромальные клетки с фенотипическими признаками гладкомышечной дифференцировки, также могущие играть роль в регуляции гемопоэза [Charbord et al., 2002; Dennis, Charbord, 2002].

Уникальным органом, где СКК образуются *de novo* и размножаются, но не дифференцируются, является **плацента**. Кроветворные клетки в ней локализованы в лабиринте и вблизи хориальной пластинки и часто бывают прикреплены к эндотелию либо контактируют с перицитами [Robin et al., 2009; Dzierzak, Robin, 2010]. Вероятно, кроветворное микроокружение плаценты организуется мезенхимными клетками (в частности, перицитами), эндотелием и трофобластом [Dzierzak, Robin, 2010]. Так, показано, что для поддержания СКК в этом органе существенна продукция SCF эндотелием [Sugiyama et al., 2011 a], а для предотвращения их преждевременной дифференцировки – взаимодействие продуцируемого эндотелием PDGF-B с его рецепторами на клетках трофобласта [Chhabra et al., 2012].

В селезенке красная и белая пульпа представляют собой два структурно и функционально различных компартмента, каждый из которых характеризуется специфическим стромальным микроокружением. В организацию ниш, обеспечивающих иммунные реакции в вовлечены фибробластические ретикулярные клетки периартериальных белой пульпе, влагалищ, являющиеся преобладающим стромальным элементом Т-клеточной зоны; фолликулярные дендритные клетки, играющие важную роль в активации В-клеток в лимфоидных фолликулах; маргинальные ретикулярные клетки на границе Т-и В-клеточных зон [den Haan et al., 2012]. Миелоидное кроветворение происходит в красной пульпе, прежде всего в пренатальный период. В активно кроветворящей зародышевой селезенке кроветворные предшественники контактируют с ретикулярными клетками, эндотелием, макрофагами и интердигитирующими клетками, что может указывать на участие всех этих типов клеток в контроле гемопоэза [Liu et al., 1994]. В постнатальном онтогенезе описана тесная ассоциация СКК с эндотелием селезенки [Kiel et al., 2005], который, как предполагается, может функционировать в качестве резервной ниши для поддержания пролиферации кроветворных клеток при угнетении костномозгового кроветворения [Yin, Li, 2006]. Судя по результатам экспериментов *in vitro*, в поддержании различных направлений кроветворной дифференцировки могут участвовать также и фибробласты селезенки [Tsuchiyama et al., 1995].

В тимусе, кроветворная функция которого состоит исключительно в обеспечении дифференцировки кроветворных родоначальных клеток в Т-лимфоциты, главным компонентом стромы являются эпителиальные клетки, формирующие трехмерную сеть в корковом и мозговом веществе. Первоначальный контакт с лигандами Notch на поверхности эпителиоцитов приводит к коммитированию мигрирующих в тимус родоначальных клеток к дифференцировке в Т-лимфоциты. В дальнейшем диффернцирующиеся клетки мигрируют через корковое и мозговое вещество, последовательно оказываясь в функционально различных нишах. Точный состав и структура этих ниш неясны, но предполагается, что в организации микроокружения тимуса наряду с эпителием могут участвовать дендритные клетки, эндотелий и мигрирующие из нервного гребня мезенхимные клетки [Gordon, Manley, 2011]. Регуляторная роль последних подтверждается тем, что полноценная дифференцировка Т-клеток *in vitro* под влиянием эпителия тимуса требует обязательного присутствия окружающей этот орган мезенхимы или происходящих из нее фибробластов, а экстирпация нервного гребня ведет к нарушению развития тимуса [Suniara et al., 2000]. Выделенные из тимуса линии ретикулярных клеток цитокины, стимулирующие не только пролиферацию тимоцитов, выделяют но И гранулоцитопоэз [Faas et al., 1993].

Таким образом, клеточный состав кроветворных ниш имеет специфические особенности в зависимости от их органной локализации, хотя некоторые типы клеток (прежде всего стромальные механоциты и эндотелий) являются общими для различных органов гемопоэза.

4.3.1.2. Механизмы стромальной регуляции кроветворения

Действуя в совокупности, стромальные элементы различных типов создают необходимые условия для поддержания гемопоэза, обеспечивающие одновременно неистощимость кроветворной системы и ее адекватный ответ на текущие потребности организма. На пролиферацию и дифференцировку кроветворных клеток влияют как выделяемые стромой гуморальные факторы, так и непосредственные контакты с окружающими клетками и внеклеточным матриксом, причем эти механизмы регуляции гемопоэза тесно связаны между собой.

Хотя некоторые гуморальные регуляторы кроветворения действуют на дальнем расстоянии, поступая в органы гемопоэза через кровоток – в частности, эритропоэтин, основным местом продукции которого в половозрелом организме являются почки [Eckardt, 1996; Jelkmann, 2011], и колониестимулирующие факторы, выделяемые в том числе сердцем и легкими [Metcalf, 1989] - большинство из них паракринно секретируются клетками кроветворного микроокружения. Строма кроветворных органов конститутивно или под влиянием индукторов продуцирует различные цитокины, влияющие как на ранние стволовые/родоначальные клетки, так и на коммитированные клетки того или иного ряда - SCF, Г-КСФ, М-КСФ, ГМ-КСФ, тромбопоэтин, ангиопоэтин-1, ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-11, ИЛ-14, ИЛ-15, Flt-3/Flk-2-лиганд, LIF [Gimble et al., 1990; Quesenberry et al., 1990; Yan et al., 1990; Paul et al., 1991; Guttierrez-Ramos et al., 1992; Wineman et al., 1996; Guerriero et al., 1997; Möhle et al., 1997; Rafii et al., 1997; Sensebe et al., 1997; Taichman et al., 1997; Majumdar et al., 1998; Nelissen et al., 2000; Yanai, Obinata, 2001; Mendes-Ferrer et al., 2010; Psaila et al., 2012]. В регуляции судьбы кроветворных клеток участвуют также секретируемые стромой белки Wnt [Van Den Berg et al., 1998] и их антагонисты [Cain, Manilay, 2013]. Кроме того, элементы стромы привлекают кроветворные клетки, продуцируя хемоаттрактанты, прежде всего SDF-1 [Van Overatraeten-Schlögel et al., 2006; Nakanishi et al., 2011]. Источниками разнообразных кроветворных цитокинов и хемоаттрактантов являются фибробласты [Yan et al., 1990; Mayumdar et al., 1998], эндотелий [Möhle et al., 1997; Rafii et al., 1997; Ponomaryov et al., 2000], миоидные клетки [Sensebe et al., 1997], макрофаги [Quesenberry et al., 1990], адипоциты [Gimble et al., 1990] остеобласты [Taichman et al., 1997; Nelissen et al., 2000; Ponomaryov et al., 2000; Psaila et al., 2012], CAR-клетки [Sugiyama, Nagasawa, 2012], периваскулярные клетки,

экспрессирующие нестин [Mendes-Ferrer et al., 2010], печеночный и желчный эпителий [Eckardt, 1996; Lamy et al., 1997; Aiuti et al., 1998; Chou, Lodish, 2010; Sugiyama et al., 2011 b], клетки Ито [Kubota et al., 2007; Гумерова, Киясов, 2010].

Регуляторный эффект цитокинов, секретируемых кроветворной стромой, существенно зависит от их взаимодействий с компонентами внеклеточного матрикса. Известна способность гликозаминогликанов, прежде всего гепарансульфата, связывать факторы роста за счет большого отрицательного заряда или наличия специфической последовательности углеводов в сайте связывания белка [Ruoslahti, Yamaguchi, 1991]. В частности, гепарансульфат адсорбирует ГМ-КСФ, а также ИЛ-3, выделяемый стромальными клетками в крайне малых количествах [Gordon et al., 1987; Roberts et al., 1988]. Связывание цитокинов с матриксными протеогликанами может не только концентрировать цитокины вблизи кроветворных клеток, но и защищать их от деградации, придавать необходимую для связывания с рецепторами конформацию или, напротив, ингибировать активность [Ruoslahti, Yamaguchi, 1991]. Локальный контроль активности цитокинов может также осуществляться путем их ферментативного расщепления стромальными клетками. Известно, например, что мембранный антиген костномозговой стромы CD10 представляет собой эндопептидазу, способную деградировать ИЛ-16 и таким образом на рост клеток в ответ на этот фактор [Delicat et al., 1994], а протеолитические ферменты, выделяемые остеокластами, могут расщеплять SCF и SDF-1 [Psaila et al., 2012; Sugiyama, Nagasawa, 2012]. Кроме того, некоторые кроветворные цитокины (SCF, Flk-2-лиганд) продуцируются не только в растворимой форме, но и в виде трансмембранных белков, оказывая регуляторное действие на кроветворные клетки при их непосредственном контакте со стромой [Toksoz et al., 1992; Lyman et al., 1993]. На поверхности стромальных клеток присутствуют и другие регуляторные молекулы, вовлеченные в прямые межклеточные взаимодействия с кроветворными предшественниками. В частности, в регуляции пролиферации и дифференцировки кроветворных клеток существенную роль играют взаимодействия их рецепторов Notch с лигандами Jagged-1, Delta-1 и Delta-4 на клетках стромы [Varnum-Finney et al., 1998; Neves et al., 2006; Sugimoto et al., 2006].

Большое значение в регуляторных взаимодействиях между стромальными и кроветворными клетками имеют их взаимное узнавание и адгезия, опосредуемые различными поверхностными молекулами. Элементы стромы способствуют удержанию кроветворных клеток в органах гемопоэза за счет специфических взаимодействий углеводных остатков на строме с мембранными лектинами кроветворных клеток [Tavassoli, Hardy, 1990]. Большинство ранних кроветворных клеток экспрессируют интегрин α4β1 (VLA-4), через который взаимодействуют с VCAM-1 на клетках стромы [Simmons et al., 1992]. Это взаимодействие существенно для лимфоидной дифференцировки [Miyake et al., 1991; Okuyama et al., 1995], а

также для контроля удержания клеток в кроветворных органах и их выхода в кровоток [Jacobsen et al., 1996; Ulyanova et al., 2005]. Адгезия к строме клеток макрофагального ряда и ранних эритроидных и миелоидных клеток связана с экспрессией на них ICAM-1 [Arkin et al., 1991]. регуляции кроветворения Предполагается, что В задействованы также адгезивные взаимодействия через ALCAM, присутствующий как на стромальных клетках, так и на кроветворных; известно, что уровень его экспрессии на последних коррелирует с их способностью к пролиферации [Nelissen et al., 2000]. Стромальная регуляция гемопоэза опосредована также взаимодействием кроветворных клеток с различными компонентами внеклеточного матрикса – прежде всего фибронектином, адгезивность к которому наиболее характерна для ранних родоначальных клеток и клеток эритроидного ряда [Weinstein et al., 1989; Vuillet-Gaugler et al., 1990], гемонектином, к которому селективно прикрепляются al.. предшественники [Campbell] et 1990]. И тромбоспондином, гранулоцитарные обеспечивающему адгезию коммитированных в различных направлениях кроветворных родоначальных клеток, особенно наиболее примитивных [Long, Dixit, 1990; Long et al., 1992]. Для эритропоэза и лимфопоэза важна адгезия к тенасцину-С [Sakai et al., 1995; Seki et al., 2006]. Кроме того, кроветворные клетки прикрепляются к определенным изоформам ламинина [Siler et al., 2000] и коллагена [Klein et al., 1995], а также к геперансульфату [Hangoc et al., 1993]. В ходе дифференцировки кроветворных клеток экспрессия ими рецепторов адгезии (в частности интегринов α4β1 и α5β1) снижается, что приводит к ослаблению способности прикрепляться к строме и способствует выходу зрелых клеток в циркуляцию [Campbell et al., 1990; Long, Dixit, 1990; Kerst et al., 1993]. Следует отметить, что внеклеточный матрикс не только служит субстратом для прикрепления кроветворных клеток, обеспечивая их удержание в контакте со стромой и доступ к продуцируемым ею ростовым факторам, но может также изменять чувствительность клеток к этим факторам [Weinstein et al., 1989; Long et al., 1992] и служить для них пролиферативным стимулом [Weinstein et al., 1989; Siler et al., 2000].

Соотношение дистантных и локальных механизмов регуляции неодинаково для разных рядов кроветворной дифференцировки и на разных ее стадиях. Так, для выживания и дифференцировки родоначальных клеток гранулоцитов и макрофагов в ряде случаев оказывается достаточно кондиционированной стромальными клетками среды с растворимыми факторами, тогда как для дифференцировки В-лимфоцитов или эффективного эритропоэза под влиянием тех же стромальных клеток необходим физический контакт с ними [Kirney, Dorshkind, 1987; Li et al., 1987; Ohneda, Bautch, 1997]. Особенно требовательны к контакту со стромой СКК и ранние родоначальные кроветворные клетки. Ряд линий стромальных клеток обеспечивают их выживание и пролиферацию только при непосредственном межклеточном взаимодействии [Itoh et al., 1989; Aizawa et al., 1992; 1994; Nanno et al., 1994; Wineman et al.,

1996]. В длительных культурах костного мозга по методу Декстера наиболее примитивные покоящиеся стволовые клетки также находятся в тесной связи со стромой, внутри адгезивного клеточного слоя [Rogers, Berman, 1993]. Есть основания полагать, что прямые взаимодействия со стромальным микроокружением через специфические поверхностные молекулы критичны для самоподдержания СКК [Kim et al., 2009; Iwasaki et al., 2010].

Следует также отметить некоторые различия в механизмах регуляции гемопоэза микроокружением в зависимости от органной локализации и стадии онтогенеза. Так, стромальные клетки печени зародыша превосходят таковые из зрелого костного мозга по уровню экспрессии регуляторов сигнального пути Wnt, но слабее экспрессируют компоненты сигнального пути Notch [Martin, Bhatia, 2005]. Кроме того, для стромальных элементов зародышевой печени характерна сниженная по сравнению с костномозговыми экспрессия VCAM-1, но при этом они эффективнее обеспечивают адгезию кроветворных клеток, опосредуемую, очевидно, другими молекулами [Koenig et al., 2002]. Не исключено, что подобные особенности стромальной регуляции являются причиной неодинакового поведения СКК в этих органах – в частности, их активной пролиферации в зародышевой печени в отличие от зрелого костного мозга [Martin, Bhatia, 2005].

4.3.1.3. Роль МСК в поддержании кроветворения

МСК являются предшественниками большинства типов клеток, составляющих строму кроветворных органов (в частности, остеобластов, адипоцитов, ретикулярных и миоидных клеток), однако их роль в регуляции гемопоэза не сводится только к дифференцировке в более специализированные стромальные элементы. Функционально важным компонентом кроветворного микроокружения являются и недифференцированные мультипотентные МСК. В частности, стромальные клетки костного мозга, экспрессирующие нестин и обеспечивающие поддержание СКК в васкулярной нише, представляют собой примитивную субпопуляцию МСК, способных к самоподдержанию и обладающих остео-, адипо- и хондрогенными потенциями [Mendes-Ferrer et al., 2010]. Более зрелой субпопуляцией МСК или их непосредственным потомством предположительно являются CAR-клетки, для которых показана способность к остео- и адипогенезу [Ehninger, Trumpp, 2011; Sugiyama, Nagasawa, 2012]. Имеются данные, что МСК костного мозга способны обеспечивать пролиферацию ранних кроветворных клеток *in vitro* [Reese et al., 1999; Nishioka et al., 2003; Wagner et al., 2007] и их миелоидную дифференцировку [Liu et al., 2011 b], стимулировать образование кроветворных предшественников из эмбриональных стволовых клеток [Wang et al., 2003] и поддерживать гемопоэз в длительной культуре, хотя и менее эффективно по сравнению с более
зрелыми клетками костномозговой стромы [Majumdar et al., 1998]. Способностью к поддержанию кроветворения *in vitro* также обладают МСК из других органов гемопоэза – аорто-гонадо-мезонефральной области [Wang et al., 2008] и зародышевой печени [Hu et al., 2001]. В той или иной степени эта способность свойственна и МСК, выделенным из некроветворных тканей: толстого кишечника [Signore et al., 2012], обонятельной выстилки [Diaz-Solano et al., 2012], жировой ткани [Corre et al., 2006; Wagner et al., 2007].

Влияние МСК на кроветворные клетки опосредовано теми же механизмами, что и в случае других компонентов стромы – секрецией растворимых факторов, продукцией внеклеточного матрикса и экспрессией поверхностных молекул, обеспечивающих прямые межклеточные взаимодействия. Ряд цитокинов, вырабатываемых МСК, воздействуют на СКК – в частности, Flt-3 лиганд и SCF, способствующие их самоподдержанию, ИЛ-6 и тромбопоэтин, влияющие на пролиферацию и дифференцировку [Li, Wu, 2011]. МСК продуцируют и другие кроветворные факторы различного спектра действия – М-КСФ, ГМ-КСФ, ИЛ-11, LIF, TNF а [Haynesworth et al., 1996; Majumdar et al., 1998; 2000; Wallace et al., 2001; Vacanti et al., 2005; Van Overstraeten-Schlögel et al., 2006]. Кроме того, МСК выделяют SDF-1, что способствует удержанию кроветворных клеток в нише, где они подвергаются паракринному действию цитокинов [Van Overstraeten-Schlögel et al., 2006; Nakanishi et al., 2011]. В регуляции гемопоэза путем непосредственных взаимодействий с кроветворными клетками, по некоторым данным, участвуют такие мембранные молекулы МСК, как VCAM-1, ICAM-1, ALCAM, молекула адгезии нервных клеток (N-CAM), Е-селектин, N-кадгерин, кадгерин-11 и интегрины, а также продуцируемые МСК белки внеклеточного матрикса – в частности, фибронектин [Seshi et al., 2000; Wagner et al., 2007; Li, Wu, 2011]. По-видимому, именно прямым межклеточным взаимодействиям принадлежит главная роль в способности МСК к поддержанию примитивных кроветворных клеток: есть данные, что у МСК различной органной принадлежности эта способность коррелирует с экспрессией генов мембранных молекул адгезии, но не с профилем секреции цитокинов [Wagner et al., 2007].

Ключевая роль МСК в организации кроветворного микроокружения подтверждается их способностью не только поддерживать гемопоэз *in vitro*, но и способствовать восстановлению кроветворения при трансплантации сублетально облученным животным [Chunmeng, Tiamin, 2004], улучшать приживление трансплантированных совместно с ними донорских кроветворных клеток [Bensidhoum et al., 2004; Han et al., 2007] и организовывать эктопические очаги гемопоэза при пересадке под кожу [Miura et al., 2006], а также уже упоминавшейся корреляцией между содержанием КОЕ-Ф и активностью гемопоэза в различных кроветворных органах мыши в течение онтогенеза [Van Den Heuvel et al., 1987; Wolf et al., 1995].

4.3.2. Характеристика МСК из дефинитивных и транзиторных органов гемопоэза

4.3.2.1. Костный мозг

Костный мозг явился одним из первых органов, где были идентифицированы клетки с характеристиками МСК [Фриденштейн и др., 1970; Кейлис-Борок и др., 1971; Friedenstein et al., 1976]. К настоящему времени популяция МСК из этого источника остается наиболее полно охарактеризованной и в определенном смысле служит эталоном при сравнении свойств соответствующих клеток, локализованных в различных тканях [Götherström et al., 2003; Fukuchi et al., 2004; Panepucci et al., 2004; Sabatini et al., 2005; Kern et al., 2006; Guillot et al., 2007; Zhang et al., 2009; Signore et al., 2012]. МСК выделены из костного мозга человека [DiGirolamo et al., 1999; Muraglia et al., 2000; Gronthos et al., 2003] и большинства видов лабораторных и сельскохозяйственных животных, в частности, крысы [Javason et al., 2001], кролика [Nathan et al., 2003], свиньи [Vacanti et al., 2005; Heino et al., 2012], макаки резус [Izadpanah et al., 2005], собаки [Kadiyala et al., 1997], кошки [Martin et al., 2002], овцы [Rhodes et al., 2004], лошади [Vidal et al., 2006], крупного рогатого скота [Bosnakovski et al., 2005] и мыши [Meirelles, Nardi, 2003; Peister et al., 2004], хотя в последнем случае получение гомогенной популяции МСК затрудняется ее загрязненностью кроветворными клетками и требует особых протоколов выделения и культивирования [Sun et al., 2003; Soleimani, Nadri, 2009].

Содержание МСК в костном мозге человека, по разным данным, составляет от 1 на 2000 до 1 на 100000 ядерных клеток [Хоптынская и др., 1984; Guerriero et al., 1997; Pittenger et al., 1999; Kern et al., 2006]; близка к этим значениям и их относительная численность у других видов [Горская и др., 1976; Brockbank et al., 1983; Martin et al., 2002; Meirelles, Nardi, 2003; Vidal et al., 2006]. Расположены они в позиции перицитов или адвентициальных ретикулярных клеток [Jones, McGonagle, 2008] либо в эндостальной области [Tormin et al., 2011]; при этом в обеих локализациях клетки сходны по фенотипу и потенциям [Tormin et al., 2011].

Фенотип костномозговых МСК различной видовой принадлежности типичен для этой категории клеток. В частности, они экспрессируют CD73, CD105, CD90, CD44, CD29, CD59 и CD13 и лишены кроветворных маркеров [Martin et al., 2002; Sun et al., 2003; Zhou et al., 2003; Izadpanah et al., 2005; Анохина, Буравкова, 2007; Осипова и др., 2009; Tormin et al., 2011]. МСК костного мозга обладают выраженными потенциями к остеогенезу, адипогенезу и хондрогенезу *in vitro* [Sun et al., 2003; Izadpanah et al., 2005; Kern et al., 2006; Liu et al., 2006; Soleimani, Nadri, 2009; Tormin et al., 2011]. Они также могут быть индуцированы к дифференцировке в теноциты [Altman et al., 2002; Lee et al., 2011], эндотелий [Campioni et al., 2003; Oswald et al., 2004; Janeczek Portalska et al., 2012], а по некоторым данным – в клетки с фенотипическими и

морфологическими характеристиками кардимомиоцитов [Duan et al., 2005; Zhang et al., 2005 a; Dong et al., 2006; Ye et al., 2006], глиальные и нейроноподобные клетки [Woodbury et al., 2000; Chu et al., 2004; Hermann et al., 2004; Suzuki et al., 2004; Cho et al., 2005], гепатоциты [Lee et al., 2004; Shu et al., 2004; Kang et al., 2005] и β -клетки панкреатических островков [Chen et al., 2004 a; Moriscot et al., 2005]. *In vivo* при трансплантации экспериментальным животным в диффузионных камерах или на пористых носителях МСК костного мозга формируют костную и хрящевую ткани [Ashton et al., 1980; Friedenstein et al., 1987; Hanada et al., 1997; Kadiyala et al., 1997; Pittenger, Marshak, 2001; Nakano et al., 2009; Zheng et al., 2010].

Как было отмечено выше, за счет секреции широкого спектра цитокинов и взаимодействия с кроветворными клетками через поверхностные молекулы, а также дифференцировки в различные компоненты стромы костного мозга, МСК этого органа играют ключевую роль в регуляции гемопоэза [Majumdar et al., 1998; Van Overstraeten-Schlögel et al., 2006; Wagner et al., 2007]. Есть данные, что по способности обеспечивать адгезию и самоподдержание кроветворных клеток они превосходят стромальные клетки ИЗ некроветворных тканей – в частности, жировой [Corre et al., 2006; Wagner et al., 2007]. Следует отметить, что в пренатальном онтогенезе, когда кроветворная активность костного мозга еще не достигает максимума, содержащиеся в нем МСК менее способны к поддержанию гемопоэза in vitro, чем соответствующие клетки зрелого костного мозга [Liu et al., 2011 b].

4.3.2.2. Печень

Печень является основным кроветворным органом на протяжении значительной части пренатального онтогенеза млекопитающих. Так, у мыши гемопоэз в ней начинается с 10–11-х суток эмбрионального развития, достигает максимума на 14-е сутки, после чего начинает снижаться и полностью прекращается в первые несколько суток после рождения [Sasaki, Sonoda, 2000; Guo et al., 2009]. У крысы, по некоторым данным, наиболее активное кроветворение в печени происходит с 14-х по 20-е сутки эмбриогенеза [Fukumoto, 1992]. В период высокой кроветворной активности печень является сравнительно богатым источником MCK. Так, у плода человека в первом триместре развития она содержит 1,1 - 3 MCK на 100000 клеток [Campagnoli et al., 2007]. На поздних сроках пренатального развития и в первые дни после рождения содержание MCK в печени значительно снижается [Van Den Heuvel et al., 1987; Wolf et al., 1995], однако в некотором количестве они сохраняются даже в зрелой печени как у мыши [da Silva Meirelles et al., 2006], так и у человека [Pan et al., 2011].

Некоторые авторы отождествляют МСК печени с клетками Ито, для которых показаны соответствие иммунофенотипу МСК, потенции к остео- и адипогенезу и способность поддерживать гемопоэз *in vitro* [Kordes et al., 2013]. Однако против этой гипотезы свидетельствует отсутствие на клетках Ито антигена CD90 [Dudas et al., 2007; 2009] при том, что на поверхности МСК зародышевой печени этот маркер присутствует [in't Anker et al., 2003; Zhao et al., 2004; Götherström et al., 2005; Guillot et al., 2008].

В целом по антигенному фенотипу МСК из печени зародышей различной видовой принадлежности подобны таковым из других источников. Помимо CD90, они экспрессируют CD29, CD44, CD73, CD105, CD166 (ALCAM) при отсутствии кроветворных маркеров [Campagnoli et al., 2001; in't Anker et al., 2003; Götherström et al., 2003; 2005; Guillot et al., 2008; Joshi et al., 2012]. В соответствующих индукционных средах они, по данным большинства авторов, способны к остео-, адипо- и хондрогенной дифференцировке [Campagnoli et al., 2001; Götherström et al., 2003; Krupnick et al., 2004; Zhao et al., 2004; Badillo et al., 2007; Guillot et al., 2007; Скоробогатова и др., 2008; Moreno et al., 2010]. Сообщалось также об успешной индукции дифференцировки МСК из печени зародышей овцы в эндотелий и кардиомиоциты [Krupnick et al., 2004] и спонтанной дифференцировке МСК зародышевой печени мыши в миофибробласты, экспрессирующие α-гладкомышечный актин [Badillo et al., 2007]. Сведения об их способности к гепатоцитарной дифференцировке противоречивы [Zhao et al., 2004; Joshi et al., 2012]. Как и МСК из костного мозга, эти клетки обладают иммуносупрессивными свойствами - не вызывают пролиферативного ответа аллогенных Т-клеток, подавляют стимулированную митогенами пролиферацию лимфоцитов *in vitro* и замедляют отторжение чужеродных трансплантатов кожи [Götherström et al., 2003; Le Blanc, 2003; Moreno et al., 2010].

В то же время ряд особенностей МСК из печени зародышей отличают их от соответствующих клеток из других источников. По сравнению с МСК зрелого костного мозга они более активно пролиферируют [Versele et al., 1987; Götherström et al., 2003; Guillot et al., 2007; Moreno et al., 2010] и усиленно экспрессируют гены, связанные с пролиферацией и ранними стадиями дифференцировки, при сниженной экспрессии генов, отвечающих за терминальную дифференцировки и иммунный ответ [Götherström et al., 2005]. Некоторые авторы отмечают также меньшую выраженность их потенций к остеогенезу [Fromigue et al., 2008] и адипогенезу [Ryden et al., 2003] или даже полную неспособность к адипо- и хондрогенезу [Wenceslau et al., 2011]. Повышенная пролиферативная активность и меньшая склонность к терминальной дифференцировке могут отражать незрелость МСК в пренатальном онтогенезе по сравнению с постнатальным, однако по некоторым характеристикам МСК зародышевой печени отличаются и от клеток, выделенных из других тканей на той же стадии

развития. В частности, они уступают МСК из костного мозга, легкого, селезенки и крови зародыша по остеогенным потенциям [in't Anker et al., 2003; Guillot et al., 2008].

Прямые экспериментальные подтверждения способности МСК из зародышевой печени к поддержанию гемопоэза немногочисленны [Hu et al., 2001], однако есть все основания предполагать, что их роль в организации кроветворной ниши аналогична таковой в костном мозге. МСК из печени зародышей продуцируют кроветворные цитокины, в частности, ГМ-КСФ и ИЛ-6 [Joshi et al., 2012] и несут на поверхности важную для регуляции гемопоэза молекулу адгезии VCAM-1 [Campagnoli et al., 2001], хотя по уровню ее экспрессии уступают стромальным клеткам зрелого костного мозга [Götherström et al., 2005]. Функциональная роль локализованных в печени МСК может заключаться в их регуляторном влиянии не только на кроветворные клетки, но и на печеночный эпителий. Так, показано, что МСК из печени плодов человека, трансплантированные в поврежденную печень иммунодефицитных мышей совместно с донорскими гепатоцитами, улучшают приживление последних [Joshi et al., 2012], а введение среды, кондиционированной МСК из печени взрослого человека, мышам после частичной гепатэктомии способствует более эффективной регенерации печени [Fouraschen et al., 2012].

4.3.2.3. Селезенка

Хотя селезенка наряду с костным мозгом стала одним из первых органов, где были обнаружены КОЕ-Ф [Фриденштейн и др., 1970; Горская и др., 1976; Friedenstein et al., 1976], МСК из этого источника изучены относительно слабо. В ходе онтогенеза активное миелоидное кроветворение в селезенке сменяется преимущественно (у грызунов) или исключительно (у человека) лимфопоэзом. В литературе имеются сообщения о выделении клеток с характеристиками МСК из селезенки как на пренатальных стадиях развития [in't Anker et al., 2003], так в постнатальном онтогенезе человека и мыши [da Silva Meirelles et al., 2006; Hoogduijn et al., 2007; Krampera et al., 2007 b; Hegyi et al., 2010].

Содержание клоногенных МСК в селезенке с возрастом значительно снижается [Brockbank et al., 1983; Van Den Heuvel et al., 1987; Friedenstein et al., 1999; Лебединская и др., 2005]; у взрослого человека оно оценивается как 0,12 – 2,6 КОЕ-Ф на 100000 ядерных клеток [Хоптынская и др., 1984], у мыши как 0,20 на 100000 клеток [Горская и др., 1976], что в обоих случаях приблизительно на порядок меньше, чем в костном мозге тех же доноров. В то же время в пренатальном онтогенезе селезенка вносит существенный вклад в общее число МСК; так, у плода человека во втором триместре развития по содержанию этих клеток она лишь менее чем в два раза уступает костному мозгу [in't Anker et al., 2003].

Фенотип МСК селезенки в целом подобен таковому в костном мозге и других органах: они лишены маркеров кроветворных или эндотелиальных клеток и несут на своей поверхности CD90, CD105, CD44, CD29, CD166 и, по данным некоторых, но не всех авторов, CD73 [in't Anker et al., 2003; da Silva Meirelles et al., 2006; Hoogduijn et al., 2007; Hegyi et al., 2010]. B условиях *in vitro* показаны их потенции к остео- и адипогенезу [in't Anker et al., 2003; da Silva Meirelles et al., 2006; Hoogduijn et al., 2007; Hegyi et al., 2010]; сообщалось также об успешной индукции нейральной дифференцировки [Krampera et al., 2007 a]. По некоторым данным, в пренатальном онтогенезе человека МСК из селезенки менее способны к адипогенезу, чем клетки из костного мозга, печени и легких тех же плодов [in't Anker et al., 2003], a MCK селезенки половозрелой мыши имеют сниженные по сравнению с клетками костного мозга остеогенные потенции [da Silva Meirelles et al., 2006]. О слабой способности МСК зрелой селезенки к остеогенезу говорят и результаты их трансплантации животным в диффузионных камерах: в отличие от клеток из костного мозга, в этом случае они дают только соединительную ткань [Фриденштейн и др., 1970; Ashton et al., 1980]. Впрочем, костная дифференцировка МСК из селезенки морской свинки может быть достигнута путем их трансплантации совместно с эпителием мочевого пузыря, являющимся у этого вида животных индуктором остеогенеза in vivo [Фриденштейн и др., 1970]. В то же время ряд авторов сообщают о сопоставимых остео- и адипогенных потенциях МСК из костного мозга и селезенки при культивировании в индукционных средах [Krampera et al., 2007 b; Hegyi et al., 2010].

Роль МСК селезенки в регуляции гемопоэза практически не изучена. Известно, что в длительной культуре строма развивающейся или зрелой селезенки способна поддерживать пролиферацию гранулоцитарно-макрофагальных родоначальных клеток [Van Den Heuvel et al., 1991 b] и образование дендритных клеток [Hinton et al., 2011]; из селезенки получены также линии стромальных клеток, поддерживающие различные направления кроветворной дифференцировки *in vitro* [Yanai et al., 1989; Tsuchiyama et al., 1995; Okubo et al., 2000] и при трансплантации *in vivo* [Fukushima et al., 1994]. Однако соотношение типов стромальных клеток, обеспечивающих эти функции, с МСК остается неясным.

5. Проблемы использования МСК в регенеративной медицине

МСК Сравнительная выделения легкость ИЗ тканей, ИХ относительная нетребовательность к условиям культивирования и неоднократно показанная в экспериментах способность К направленной миграции в поврежденные ткани и поддержанию восстановительных процессов делают эти клетки весьма привлекательными для использования в терапевтических целях при широком спектре заболеваний. Хотя по пролиферативным

способностям и набору возможных направлений дифференцировки МСК уступают эмбриональным стволовым клеткам, они имеют и ряд важных преимуществ с точки зрения клинического применения. Получение МСК не связано с моральными и правовыми ограничениями, возникающими при использовании эмбриональных стволовых клеток, а их ограниченный пролиферативный потенциал снижает риск образования опухолей у реципиента. Немаловажной является возможность получения аутологичных МСК из тканей пациента, а также их низкая иммуногенность, позволяющая проводить аллогенные трансплантации. В качестве источников МСК для клеточной терапии наибольшее значение имеют костный мозг и подкожная жировая ткань, которые легко доступны и содержат большое количество хорошо охарактеризованных клеток, а процедура их забора относительно малотравматична [Владимирская, 2007]. Рассматривается возможность выделения МСК для терапевтических целей из зубной пульпы [Laino et al., 2006; Рарассіо et al., 2006] тканей последа – плаценты и пуповины [Romanov et al., 2003; Fauza, 2004], а также десквамированного эндометрия, содержащегося в менструальной крови [Земелько и др., 2011].

Первым примером успешного использования МСК в клеточной терапии стала трансплантация аллогенного костного мозга детям с несовершенным остеогенезом (osteogenesis imperfecta), что привело к улучшению гистологической структуры костной ткани, усилению ее минерализации, повышению скорости роста и снижению частоты переломов [Horwitz et al., 1999]. В последние годы МСК всё шире используются при лечении самых разнообразных заболеваний. Основные направления ИХ клинического применения включают котрансплантацию с СКК для более эффективного поддержания гемопоэза; замещение и восстановление функций поврежденных некроветворных тканей; подавление нежелательных иммунных реакций при аллогенных трансплантациях и аутоиммунных заболеваниях [Владимирская, 2007; Татаринова и др., 2009].

5.1. Подходы к клиническому использованию МСК

5.1.1. Системное введение

В основе терапевтической эффективности внутривенно вводимых МСК лежит их способность к направленной миграции в область повреждения под влиянием воспалительных цитокинов и хемокинов [Chamberlain et al., 2007; Salem, Thiemermann, 2010; Baglio et al., 2012]. Трансплантабельность МСК была показана в многочисленных работах по их системному введению экспериментальным животным. Через различные сроки после трансплантации потомство донорских клеток находили во многих тканях и органах реципиентов – в частности,

в скелетной мускулатуре, нервной системе, сердце, костной и хрящевой тканях, легких, селезенке, костном мозге, печени, почках и коже [Pereira et al., 1998; Allers et al., 2004; Anjos-Afonso et al., 2004; Kraitchman et al., 2005; Lee et al., 2006]. При наличии у реципиента тех или иных повреждений значительное количество введенных MCK обнаруживается в патологически измененных участках тканей – в кожных ранах [Sasaki et al., 2008; Hu et al., 2013], области инфаркта миокарда [Nagaya et al., 2004; Kraitchman et al., 2005], мозжечке при аутоиммунном энцефаломиелите [Kemp et al., 2011], поврежденных лучевой болезнью мышцах, коже, костном мозге и кишечнике [Chapel et al., 2003]. В ряде случаев показано благотворное влияние системной трансплантации MCK на восстановление структуры и функции тканей у животных-реципентов [Morigi et al., 2004; Nagaya et al., 2004; Sasaki et al., 2008; Curley et al., 2012]. Эти результаты подтверждаются и данными клинических испытаний, показавших улучшение состояния пациентов с заболеваниями различных органов – печени, головного мозга, сердца - после внутривенного введения размноженных *in vitro* аутологичных или аллогенных MCK [Bang et al., 2005; Mohamednejad et al., 2007; Hare et al., 2009].

Помимо простоты и малотравматичности подобного способа трансплантации МСК, его важное преимущество состоит в возможности обеспечивать одновременную доставку клеток во многие ткани и органы, что необходимо, в частности, при генетических и аутоиммунных заболеваниях – таких как osteogenesis imperfecta [Horwitz et al., 1999] или системная красная волчанка [Wang et al., 2013 a], а также для улучшения приживления донорских кроветворных клеток и подавления иммунных конфликтов при аллотрансплантациях [Владимирская, 2007; Татаринова и др., 2009; Salem, Thiemermann, 2010]. Однако крупный размер МСК затрудняет их прохождение через легочные капилляры, что ведет к оседанию большинства введенных клеток в легких [Kraitchman et al., 2005; Oh, 2010]. Это обстоятельство не только затрудняет достижение необходимой концентрации МСК в месте назначения [Fischer et al., 2009 b], но и создает риск развития легочной эмболии [Furlani et al., 2009].

5.1.2. Локальная доставка в место повреждения

Преимущество локальной трансплантации МСК по сравнению с системным введением состоит в возможности обеспечить высокое содержание клеток в области дефекта и исключить потери, связанные с их распространением по другим тканям, что позволяет снизить общее количество трансплантируемых клеток. В преклинических исследованиях показано, что введение МСК непосредственно в поврежденную или патологически измененную ткань способствует заживлению кожных ран [Badillo et al., 2007] и костно-хрящевых дефектов [Nathan et al., 2003; Oshima et al., 2005], уменьшает атрофию мышц и стимулирует рост сосудов

в ишемизированной конечности [Kinnaird et al., 2004; Nakagami et al., 2006], восстанавливает сниженную эректильную функцию [Bivalacqua et al., 2007], улучшает функциональные характеристики сердца при инфаркте миокарда [Yoon et al., 2005; Nakamura et al., 2007] и других его заболеваниях [Silva et al., 2005; Mias et al., 2009]. При этом местное введение МСК животным с инфарктом миокарда обеспечивает лучшую приживаемость клеток в области дефекта, чем системная трансплантация [Freyman et al., 2006]. Терапевтическая эффективность локальной доставки МСК показана у пациентов с различными патологиями сердца [Шумаков и др., 2003; Chen et al., 2004 b; 2006], скелетных тканей [Jancewicz et al., 2004; Davatchi et al., 2011], центральной нервной системы [Zhang et al., 2008; Lee et al., 2010; Park et al., 2012] и кожи [Badiavas, Falanga, 2003; Lataillade et al., 2007].

5.1.3. Тканевая инженерия

При необходимости замещения обширных тканевых дефектов локальная трансплантация МСК в виде клеточной суспензии может оказаться недостаточно эффективной. В этих случаях более перспективным подходом является тканевая инженерия – создание трансплантабельных аналогов ткани путем культивирования клеток на искусственном носителе, служащем каркасом для создаваемой тканевой конструкции и придающим ей необходимую пространственную организацию. В отличие от клеточной терапии, эффект которой обусловлен в первую очередь паракринным влиянием МСК на ткань, это направление регенеративной медицины основано на использовании потенций МСК к дифференцировке [Caplan, 2007]. При этом дифференцировка МСК может быть индуцирована *in vitro* в ходе их культивирования на носителе [Dong et al., 2001; Aung et al., 2002; Morishita et al., 2006] либо происходить в организме реципиента после трансплантации носителя с недифференцированными клетками [Чайлахян, Герасимов, 2004; Wakitani et al., 2007; Altman et al., 2008].

В качестве носителей для тканеинженерных конструкций используют различные синтетические и природные материалы. К природным материалам для носителей относятся белки и полисахариды животного, реже растительного происхождения - коллаген [Young et al., 1998; Wakitani et al., 2007; Rodrigues et al., 2013] или желатин [Ogawa et al., 2010], хитозан (Park et al., 2000), фиброин шелка [Hofmann et al., 2006], гиалуронан [Cristino et al., 2005; Zavan et al., 2007], альгинат [Ceccaldi et al., 2012], агароза [Петренко и др., 2008], различные их комбинации [Yang et al., 2010; Bhat, Kumar, 2012], а также бесклеточный матрикс, получаемый из тех или иных тканей и органов – кости [Кругляков и др., 2004; Чайлахян, Герасимов, 2004], кожи [Altman et al., 2008], мочевого пузыря [Antoon et al., 2012]. Эти материалы обладают хорошей совместимостью с организмом реципиента и высоким сродством к клеткам, но в некоторых

случаях могут вызывать иммунный ответ; кроме того, их применение затрудняется недостаточной механической прочностью и неконтролируемостью состава.

Указанных недостатков лишены синтетические материалы, позволяющие создавать носители с определенными химическим составом, структурными и механическими характеристиками. В тканевой инженерии широко применяются такие материалы, как керамика на основе фосфата кальция или гидроксиапатита [Dennis et al., 1992; Knabe et al., 2000; Noshi et al., 2001; Mastrogiacomo et al., 2005; Koga et al., 2008], поликапролактон [Li et al., 2005; Chastain et al., 2006], полимеры и сополимеры гликолевой и молочной кислот [Burg et al., 2000; Day et al., 2000; Liu et al., 2004], полиангидриды и полиортоэфиры [Марквичева и др., 2011; Швед, 2011].

Структура и механические характеристики применяемых носителей определяются свойствами восстанавливаемой ткани. Например, для создания тканеинженерных аналогов кости материал должен быть достаточно твердым, а для кожи, сердца или сосудов – более эластичным [Марквичева и др., 2011]. Для успешной реконструкции ткани важны также адгезивные свойства носителя, его способность адсорбировать белки и другие вещества из биологических жидкостей, возможность и скорость деградации в организме пациента. Методы тканевой инженерии активно разрабатываются и совершенствуются. В частности, одним из способов повысить сродство носителя к клеткам служит иммобилизация на его поверхности белков внеклеточного матрикса или их фрагментов [Dennis et al., 1992; Morishita et al., 2006; Koga et al., 2008; Швед, 2011]. Кроме того, в состав носителя могут быть включены факторы, стимулирующие рост и дифференцировку клеток [Park et al., 2000; Noshi et al., 2001; Ogawa et al., 2010] или врастание сосудов в трансплантатированную конструкцию [Швед, 2011].

В экспериментах на животных показана применимость технологий тканевой инженерии с использованием МСК для заживления дефектов кости [Кругляков и др., 2004; Mastrogiacomo et al., 2005], хряща [Koga et al., 2007], сухожилия [Young et al., 1998], кожи [Altman et al., 2008], миокарда [Ceccaldi et al., 2012]. Ведутся работы по созданию более сложных конструкций, состоящих из нескольких тканей – таких как мыщелки суставов, периодонт, комплексы кости с сухожилием, черепные швы [Rahaman, Mao, 2005; Shanti et al., 2007]. Имеются и сообщения об успешном применении тканеинженерных конструкций на основе МСК для регенерации скелетных тканей у человека [Чайлахян, Герасимов, 2004; Morishita et al., 2006; Wakitani et al., 2007; Haleem et al., 2010].

5.1.4. Генная терапия

Благодаря неоднократно показанной возможности генетической модификации МСК с помощью различных векторов [Conget et al., 2001; Aslan et al., 2006; Moreno et al., 2010] эти

клетки могут быть использованы для доставки в организм терапевтических генов. Наиболее эффективными инструментами для введения генов в МСК признаны векторы на основе ретровирусов и лентивирусов, обеспечивающие длительную экспрессию трансгена за счет интеграции в геном; применяется также транзиторная трансфекция с помощью аденовирусных векторов и различные методики трансфекции плазмидными векторами [Каршиева и др., 2013]. При этом применение тканеспецифических промоторов позволяет добиться экспрессии трансгена только в определенных тканях, несмотря на широкое распространение трансфицированных МСК по организму после их системного введения [Hou et al., 1999].

В настоящее время в преклинических исследованиях наиболее активно разрабатываются три направления генной терапии с использованием MCK. Прежде всего, клетки могут быть трансфицированы генами факторов роста и других биоактивных молекул с целью усиления их регенеративного потенциала. Показано, например, что трансфекция MCK геном VEGF [Zhou et al., 2006] или тканевой трансглутаминазы [Song et al., 2007] повышает их терапевтическую эффективность при трансплантации в зону инфаркта миокарда, а клетки, трансфицированные геном ИЛ-10, эффективнее нетрансфицированных снижают тяжесть артрита [Choi et al., 2008]. Другими примерами подобного подхода служат введение в MCK генов кроветворных цитокинов (SCF и ГМ-КСФ) для усиления их способности обеспечивать приживление кроветворных клеток при совместной трансплантации [Han et al., 2007], использование MCK, трансфицированных генами нейротрофических факторов, для лечения экспериментального инсульта [Кигоzumi et al., 2005] и клеток, трансфицированных HGF – для уменьшения воспаления и фиброза легких при их радиационном повреждении [Wang et al., 2013 c].

Другое направление генной терапии – применение МСК для коррекции генетических дефектов при наследственных заболеваниях, в частности, введение в них генов, кодирующих коллаген I типа, для лечения osteogenesis imperfecta [Pereira et al., 1995; Tarnowski et al., 2010] или фактор свертывания VIII для лечения гемофилии [Van Damme et al., 2003].

И, наконец, способность МСК к избирательной миграции в опухоли служит основанием для разработки методов их применения в генной терапии онкологических заболеваний. В экспериментальной терапии опухолей используют МСК, экспрессирующие гены различных белков с противоопухолевой активностью. В их числе - фактор TRAIL (tumor necrosis factorrelated apoptosis-inducing ligand), вызывающий апоптоз опухолевых клеток; ферменты, превращающие нетоксичные для клеток субстраты в цитотоксические продукты карбоксилэстераза); (цитозиндезаминаза, тимидинкиназа, цитокины, усиливающие противоопухолевый иммунный ответ (ИЛ-12, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7, интерфероны α и β), антиангиогенные и другие факторы [Каршиева и др., 2013]. Данная стратегия показала свою эффективность при различных опухолях у экспериментальных животных [Xiang et al., 2009;

Kim et al., 2013], однако ее успешное клиническое применение требует совершенствования методик трансфекции и трансплантации МСК.

5.2. Область применения МСК

5.2.1. Заболевания опорно-двигательного аппарата

Применение МСК для регенерации поврежденных скелетных тканей стало одним из первых направлений клеточной терапии с участием этих клеток. По данным клинических испытаний, трансплантация аутологичных МСК из костного мозга на тех или иных носителях (губка из аллогенного костного матрикса, гидроксиапатитная керамика) позволяет восстановить костную ткань у больных с ложными суставами, несросшимися переломами и остеомиелитом [Чайлахян, Герасимов, 2004] и добиться закрытия крупных костных дефектов, возникших вследствие травм или удаления опухолей [Quarto et al., 2001; Warnke et al., 2004; Morishita et al., 2006]. Сообщалось также об успешной репарации костного дефекта с помощью МСК из жировой ткани в сочетании с клетками костного мозга [Lendeckel et al., 2004]. Совершенствуются методы применения аллогенных МСК для лечения оsteogenesis imperfecta [Владимирская, 2007]. В частности, была успешно проведена внутриутробная трансплантация МСК плоду с тяжелой формой этого заболевания [Le Blanc et el., 2005].

Предпринимаются также попытки клинического использования МСК при дефектах суставного хряща, вызванных травмами и остеоартрозом, но значительное улучшение состояния больных наблюдается не во всех случаях [Чайлахян, Герасимов, 2004; Jancewicz et al., 2004; Wakitani et al., 2007; Haleem et al., 2010; Davatchi et al., 2011]. Разработка методов использования МСК для регенерации сухожилий [Lee et al., 2011; Yokoya et al., 2012] и скелетных мышц [Winkler et al., 2012; Nakabayishi et al., 2013] находится на стадии доклинических испытаний, однако результаты проведенных экспериментов указывают на потенциальную применимость этих клеток в данных областях медицины.

5.2.2. Сердечно-сосудистые заболевания

Лечение заболеваний сердечно-сосудистой системы, являющихся одной из основных причин смертности населения развитых стран, представляет собой крайне актуальную проблему. Применение МСК для восстановления поврежденной сердечной мышцы служит хорошей альтернативой трансплантации донорского сердца. По данным преклинических исследований, МСК способны стимулировать регенерацию миокарда за счет паракринного воздействия на его клетки, усиления васкуляризации, подавления апоптоза, воспаления и фиброза в очаге повреждения; не исключена и дифференцировка МСК в кардиомиоциты, хотя она не играет главной роли в их терапевтическом эффекте [Silva et al., 2005; Yoon et al., 2005; Nakamura et al., 2007; Noiseux et al., 2006; Iso et al., 2007; Mias et al., 2009]. В клинических испытаниях показано улучшение функциональных характеристик сердца при трансплантации МСК пациентам с ишемической кардиомиопатией [Chen et al., 2006], острой фазой инфаркта миокарда [Chen et al., 2004 b; Hare et al., 2009], постинфарктной сердечной недостаточностью [Шумаков и др., 2003; Mohyeddin-Bonab et al., 2007]. Мета-анализ данных 11 клинических испытаний на 832 больных с острым инфарктом миокарда, показал, что клеточная терапия повышает сократимость левого желудочка, но не влияет на его ремоделирование после инфаркта [Sun et al., 2010]. Очевидно, для полноценного восстановления структуры миокарда требуются стволовые клетки с большей, чем у МСК, способностью к приживлению в сердце и дифференцировке в кардиомиоциты [Trounson et al., 2011].

Имеется также опыт успешного применения МСК в клеточной терапии хронической ишемии нижних конечностей. У многих пациентов внутримышечная трансплантация аутологичных МСК позволяла добиться уменьшения болей и заживления трофических язв и избежать ампутации пораженной ноги [Седов и др., 2011].

5.2.3. Неврология

Актуальность применения МСК при патологиях центральной нервной системы связана с крайне низкой способностью нервной ткани к регенерации и невозможностью трансплантации дифференцированных нервных клеток ввиду их плохой приживаемости и этических проблем [Владимирская, 2007]. Имеются данные об улучшении восстановления нарушенных функций после трансплантации аутологичных МСК пациентам с ишемическим инсультом [Bang et al., 2005] и травмами головного или спинного мозга [Zhang et al., 2008; Park et al., 2012]. Частичное восстановление чувствительности и двигательной активности отмечалось и у больных с МСК. повреждением спинного мозга после трансплантации ИМ предварительно трансдифференцированных в нейральные стволовые клетки [Moviglia et al., 2006].

Наиболее активно развиваемым в последние годы направлением использования МСК в неврологии является клеточная терапия нейродегенеративных заболеваний [Trounson et al., 2011]. МСК, трансплантированные в мозг, благодаря трофической активности способны улучшить выживание нейронов реципиента и тем самым замедлить прогрессирование заболевания. Обсуждается возможность их применения для лечения болезней Хантингтона, Паркинсона [Joyce et al., 2010] и Альцгеймера [Lee et al., 2010]. В клинических испытаниях на

больных с боковым амиотрофическим склерозом и множественным склерозом показана безопасность введения МСК, однако оценка его эффективности требует продолжения исследований [Одинак и др., 2009; Karussis et al., 2010; Mazzini et al., 2012].

5.2.4. Гематология и онкология

Основанием для использования МСК в гематологии служит их ключевая роль в организации кроветворного микроокружения. Доклинические испытания показали, что МСК обеспечивают эффективное приживление донорских кроветворных клеток, даже трансплантированных в относительно малом количестве [Владимирская, 2007]. Первой попыткой клинического применения МСК для улучшения восстановления гемопоэза стала трансплантация аутологичных МСК в сочетании с СКК после химиотерапии при раке молочной железы, приведшая к быстрой нормализации содержания нейтрофилов и тромбоцитов в крови [Koç et al., 2000]. Впоследствии обнадеживающие результаты были получены при котрансплантации МСК и аллогенных кроветворных клеток больным с лейкозами [Lazarus et al., 2005; Liu et al., 2011 a] и тяжелой апластической анемией [Fang et al., 2009; Wang et al., 2013 b]. В некоторых из этих случаев введение МСК позволяло не только ускорить восстановление гемопоэза, но и предотвратить реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [Lazarus et al., 2005; Wang et al., 2013 b], а также уменьшить симптомы другого тяжелого осложнения трансплантации аллогенных кроветворных клеток – тромботической микроангиопатии [Ansari et al., 2012]. Более того, у части пациентов с апластической анемией гемопоэз удавалось восстановить трансплантацией одних МСК без кроветворных клеток [Xiao et al., 2013].

Потенциальные возможности применения МСК в онкологии не ограничены восстановлением гемопоэза после миелоаблативной терапии и обсуждавшейся выше доставкой терапевтических агентов в опухоль посредством генетически модифицированных клеток [Каршиева и др., 2013]. В экспериментах на животных показано, что трансплантация МСК приводит к заживлению радиационных повреждений кишечного эпителия, часто бывающих осложнением лучевой терапии опухолей живота и таза [Chang et al., 2013 b]. Кроме того, при стимуляции интерфероном ү МСК приобретают свойства антигенпрезентирующих клеток, что может быть использовано для усиления иммунного ответа на опухолевые антигены [Stagg et al., 2006]. Однако введение МСК онкологическим больным несет в себе серьезные риски: способность этих клеток включаться в строму опухоли, стимулировать клеточную пролиферацию и ангиогенез, а также подавлять активность иммунной системы может привести к усилению роста опухоли [Kuhn, Tuan et al., 2009; Hass, Otte, 2012]. В связи с этим к перспективам использования МСК в онкологии следует относиться с большой осторожностью.

5.2.5. Иммуноконфликтные состояния и аутоиммунные заболевания

Применение иммуносупрессивных свойств МСК для подавления иммунных конфликтов является в последнее время одним из основных направлений клеточной терапии с участием этих клеток. Так, в 2011 году на него приходилось 24 из 123 клинических испытаний с использованием МСК [Trounson et al., 2011]. Способность МСК ингибировать иммунные реакции представляет огромный интерес для предотвращения и лечения осложнений аллогенной трансплантации – отторжения трансплантата и РТПХ. По предварительным данным, системное введение МСК больным с трансплантированной почкой позволяет снизить применяемые дозы иммунодепрессантов [Peng et al., 2013] и оказать терапевтический эффект при начавшемся отторжении или фиброзе пересаженного органа [Reinders et al., 2003]. В экспериментах на животных показана потенциальная применимость МСК для предотвращения отторжения трансплантатов печени [Wan et al., 2008]. Однако как донорские, так и аутологичные МСК, введенные реципиенту перед трансплантацией органа, могут оказывать и противоположный эффект, усиливая воспаление и отторжение [Seifert et al., 2012]. Для их эффективного и безопасного клинического применения требуются дальнейшие исследования.

При острой РТПХ, являющейся одной из основных причин смерти после аллогенной трансплантации костного мозга, введение МСК позволяет значительно повысить выживаемость пациентов [von Bahr et al., 2012; Herrmann et al., 2012]. Хроническая РТПХ поддается лечению с помощью МСК несколько хуже, но и в этом случае у части больных удается получить клиническое улучшение [Weng et al., 2010; Herrmann et al., 2012].

Возможности эффективного применения МСК при аутоиммунных заболеваниях наиболее убедительно показаны на примере пациентов с системной красной волчанкой, у которых введение МСК вызывало клиническую ремиссию, улучшение функций пораженных органов и уменьшение цитопении [Wang et al., 2013 a; Li et al., 2013 a]. В то же время у больных ревматоидным артритом явных свидетельств терапевтической эффективности МСК не получено, несмотря на обнадеживающие результаты их трансплантации животным с экспериментальной моделью этого заболевания [Kim et al., 2012 a].

5.2.6. Другие заболевания

В последнее время пристальное внимание медиков привлекает возможность использования МСК для лечения различных патологий желудочно-кишечного тракта, печени, почек и легких. Так, с помощью локального или системного введения МСК удавалось добиться заживления дефектов слизистой оболочки кишечника при болезни Крона [Garcia-Olmo et al.,

2005; Duijvestein et al., 2010] и язвенном колите [Лазебник и др., 2010]; впрочем, у некоторых пациентов с болезнью Крона после трансплантации МСК течение заболевания ухудшалось [Duijvestein et al., 2010]. Улучшения в клинической картине заболевания наблюдались после введения МСК больным с декомпенсированным циррозом печени [Mohamadnejad et al., 2007; Zhang et al., 2012 c] и печеночной недостаточностью, вызванной гепатитом В [Shi et al., 2012], а также с гломерулонефритом [El-Ansary et al., 2012], туберкулезом легких [Васильева и др., 2007] и их повреждением при отравлении паракватом [Liu et al., 2012]. В преклинических испытаниях тестируется целесообразность применения МСК при токсическом поражении печени [Oyagi et al., 2006], острой почечной недостаточности [Morigi et al., 2004; Salem, Thiemermann, 2010], повреждении легких искусственной вентиляцией [Curley et al., 2012], астме, хронической обструктивной болезни легких, легочной гипертонии [Iyer et al., 2009].

Хорошие клинические результаты были получены при лечении с помощью МСК различных повреждений кожи – радиационных ожогов [Lataillade et al., 2007], незаживающих ран [Badiavas, Falanga, 2003], хронического изъязвления при буллезном эпидермолизе [Conget et al., 2010]. МСК считаются перспективным источником клеток для использования в стоматологии: тканеинженерные конструкции на их основе были успешно использованы для регенерации периодонта [Yamada et al., 2006]; обсуждается также возможность применения этих клеток для восстановления пульпы и минерализованных тканей зуба [Kim et al., 2012 a].

Имеются примеры, свидетельствующие о возможной эффективности МСК в лечении метаболических заболеваний. Так, при их трансплантации пациентам с диабетом 2-го типа снижались уровень глюкозы в крови и потребность в экзогенном инсулине, улучшались функции сердца и почек [Jiang et al., 2011; Li et al., 2013 b]. Предварительные результаты применения МСК в терапии лизосомных болезней накопления - синдрома Гурлера и метахроматической лейкодистрофии - менее убедительны: у части больных отмечено ослабление патофизиологических изменений в некоторых тканях, но без значительного улучшения общего состояния здоровья [Кос et al., 2002].

5.3. Проблемы и возможные риски применения МСК в клинике

Спектр заболеваний, которые с большим или меньшим успехом пытаются лечить с помощью МСК, постоянно расширяется. Растет и число клинических испытаний с применением этого типа клеток. Большинство авторов сообщают о хорошей переносимости трансплантации МСК и отсутствии серьезных побочных эффектов; в некоторых случаях отмечаются лишь транзиторное повышение температуры и головная боль [Одинак и др., 2009; Karussis et al., 2010; Lalu et al., 2012; Xiao et al., 2013]. Однако нельзя сбрасывать со счетов

возможные риски терапевтического применения МСК и технические трудности, препятствующие их широкому внедрению в медицинскую практику.

Для гарантии безопасной трансплантации МСК требуется детальное изучение особенностей взаимодействия введенных клеток с организмом реципиента. В частности, существует опасность нежелательного проявления трансплантированными МСК свойственных им фиброгенных или остеогенных потенций. Так, в экспериментах по трансплантации МСК в поврежденную печень крыс показана их дифференцировка в миофибробласты с развитием фиброзной ткани [Baertschiger et al., 2009], а остеогенная дифференцировка МСК, введенных крысам с хроническими заболеваниями почек, вносила вклад в вызываемую этими заболеваниями кальцификацию кровеносных сосудов [Kramann et al., 2013]. Наблюдалась также оссификация области инфаркта миокарда после внутрисердечной трансплантации нефракционированных клеток костного мозга [Yoon et al., 2004]; впрочем, последующие эксперименты не подтвердили ее связи с их введением [Ribeiro et al., 2006]. Определенный риск могут нести и иммуносупрессивные свойства МСК, вследствие которых их трансплантация может повышать чувствительность организма к инфекциям и препятствовать уничтожению малигнизированных клеток. Эти опасения подтверждаются данными о том, что трансплантированные мышам аллогенные клетки меланомы образуют опухоль только в том случае, когда вводятся совместно с МСК [Djouad et al., 2003], а введение МСК пациентам, перенесшим трансплантацию СКК, повышает смертность от пневмонии [Forslöw et al., 2012].

Другая группа проблем, ограничивающих применение МСК в клинике, связана с их выделением и культивированием. Низкое содержание МСК в тканях, особенно у пожилых пациентов, делает необходимым длительное наращивание клеточной массы in vitro, что затрудняется ограниченностью их пролиферативного потенциала. Многократное пассирование клеток ведет к изменению их характеристик и снижению терапевтической эффективности. Так, выживаемость больных с РТПХ значительно повышается только при введении им МСК после 1-2 пассажей *in vitro*; клетки 3-4-го пассажа такого эффекта не оказывают [von Bahr et al., 2012]. Более того, при длительном культивировании МСК могут претерпевать злокачественную трансформацию [Rubio et al., 2008]. Статистический анализ, обобщающий данные различных клинических испытаний на большом числе пациентов, не выявил связи введения МСК с развитием опухолей [Lalu et al. 2012], однако описан случай гибели подопытных животных от саркомы после трансплантации им МСК, подвергшихся спонтанной трансформации in vitro [Tolar et al., 2007]. Серьезную проблему представляет собой и гетерогенность популяции стромальных клеток. Отсутствие надежных маркеров, позволяющих идентифицировать субпопуляции клеток с требуемыми характеристиками, затрудняет стандартизацию клеточных препаратов и определение необходимой терапевтической дозы. Кроме того, культивирование

MCK для терапевтических целей требует исключения их контакта с ксеногенной сывороткой во избежание передачи зоонозных инфекций и развития у пациента иммунных реакций на чужеродные белки. В качестве альтернативы сыворотке плодов коровы, применяемой в стандартных протоколах культивирования MCK, предлагаются аутологичная сыворотка человека [Shahdadfar et al., 2005], лизат тромбоцитов [Doucet at al., 2005] или бессывороточные среды [Chase et al., 2012; Patrikoski et al., 2013], но оптимальный состав среды, наиболее эффективно обеспечивающий рост MCK с сохранением их потенций, еще не подобран.

Ввиду сложностей, связанных с культивированием МСК, некоторые авторы считают предпочтительным введение пациенту свежевыделенных МСК без их предварительного размножения *in vitro*; обсуждается также возможность стимуляции эндогенных МСК к миграции в область повреждения [Jones, McGonagle, 2008; Augello et al., 2010]. Еще одним подходом к использованию регенеративной способности МСК без необходимости трансплантации клеток может стать введение пациенту продуктов их секреторной активности – кондиционированной среды [Fouraschen et al., 2012; van Koppen et al., 2012; Chang et al., 2013 a] или микровезикул [Lai et al., 2010 a; Gatti et al., 2011; Baglio et al., 2012]. Однако исследования в этих направлениях находятся на начальной стадии.

Таким образом, эффективное и безопасное применение МСК в клинической практике требует дальнейшего изучения механизмов регуляции их поведения *in vivo*, а также совершенствования протоколов выделения, культивирования и трансплантации, что никоим образом не умаляет перспективности этих клеток для восстановления поврежденных или патологически измененных тканей и органов.

В целом следует отметить, что МСК в настоящее время являются одним из наиболее активно исследуемых типов стволовых и родоначальных клеток. Причины повышенного внимания к этим клеткам связаны как с появлением новых данных об их потенциях и роли в развитии организма, так и с обнадеживающими результатами их применения в регенеративной медицине. Однако многие аспекты биологии МСК по-прежнему исследованы недостаточно. Одним из таких неясных вопросов является формирование популяции МСК в онтогенезе. В частности, несмотря на ключевую роль МСК в организации кроветворного микроокружения, остается практически неизученным, как изменяются фенотипические и функциональные характеристики МСК из транзиторных и дефинитивных органов гемопоэза в процессе индивидуального развития. Всесторонний анализ зависимости свойств МСК от органной локализации и стадии развития, ставший предметом нашей работы, позволяет пролить свет на развитие соединительных тканей и кроветворной системы в онтогенезе, а перспективность МСК как ресурса для регенеративной медицины придает их изучению не только теоретическую, но и практическую значимость.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Экспериментальные животные

В работе использованы 14-, 15-, 16-, 17-, 18- и 20-суточные зародыши, 3-5-суточные и половозрелые самки и самцы неинбредных крыс Wistar, а также 14- и 17-суточные зародыши, новорожденные (1-2-суточные) и половозрелые самки и самцы мышей гибридов F1 (CBA х C57Bl/6). Первым днем эмбриогенеза считали день обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке у крыс или вагинальных пробок у мышей.

2. Культивирование клеток

2.1. Выделение клеток из тканей

Клетки костного мозга выделяли, промывая диафизы бедренных и большеберцовых костей шприцом со средой α-MEM (HyClone, США). Суспензию клеток печени, селезенки и мышц задних конечностей получали, механически измельчая ткань в культуральной среде. Ткань зрелой селезенки предварительно обрабатывали 0,25%-ным трипсином с ЭДТА (HyClone), а ткань зрелой печени – 0,1%-ным раствором коллагеназы I типа (Sigma, США) 40 мин при 37°C. Фрагменты бедренных костей зародышей обрабатывали 0,1%-ным раствором коллагеназы при 37°C, последовательно отбирая фракции через 10, 30 и 70 мин инкубации. Суспензии клеток фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 40 мкм (BD Falcon, Meксика) и при необходимости отмывали от детрита центрифугированием.

2.2. Первичные и пассируемые культуры стромальных клеток

Выделенные клетки помещали с плотностью 1×10^6 клеток/мл в культуральные флаконы площадью 25 см² (Greiner, Германия) для клонального анализа и 12-луночные платы (Greiner) для иммуноцитохимического окрашивания первичной культуры либо с плотностью 2-5х10⁶ клеток/мл во флаконы площадью 75 см² (Greiner) для последующего пассирования. Культуры инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в среде α -MEM (при изучении спонтанного миогенеза – в среде DMEM) с добавлением 10-15% сыворотки плодов коровы, L-глутамина, антибиотика-антимикотика и пенициллина-стрептомицина (все - HyClone). Среду сменяли через 7 суток. Для клонального анализа культуры клеток от половозрелых животных фиксировали через 11-12

суток после посева, от зародышей – через 8 суток. В экспериментах с пассируемыми культурами клетки снимали трипсином с ЭДТА и пересевали с плотностью 1x10⁴ – 1x10⁵ клеток/мл. Для морфологического и иммуноцитохимического анализа культуры фиксировали по достижении 50-70% конфлюэнтности (как правило, после 1-2 суток роста). Индивидуальные клоны пересевали путем наложения на выбранную колонию выдержанного в растворе трипсина с ЭДТА клонирующего диска диаметром 5 мм (Sigma), который затем переносили в лунку 12-луночной платы с ростовой средой.

2.3. Анализ адгезивных свойств стромальных и миогенных предшественников

В качестве субстратов для прикрепления клеток использовали флаконы площадью 25 см² и 12-луночные платы, покрытые коллагеном I типа или ламинином BD Biocoat (BD Biosciences, США), фибронектин из плазмы крови быка (Sigma), кислый коллаген I типа (получен из сухожилий хвостов крысы путем их обработки 0,1%-ным раствором уксусной кислоты), фибронектин из плазмы крови человека, его протеолитические фрагменты 120 кДа, 40 кДа и 60 кДа, а также нейтральный коллаген I типа (любезно предоставлены А.А. Мининым, Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН). Нейтральным коллагеном, фибронектином и его фрагментами культуральную посуду покрывали, нанося раствор белка в концентрации 50 мкг/мл и высушивая 2 ч в ламинарном боксе, а кислым коллагеном – инкубируя с ним 30 мин при 37°С с последующей тщательной отмывкой раствором Хэнкса (Биолот, Россия).

Для оценки числа КОЕ-Ф, прикрепляющихся к субстрату в разные сроки культивирования, клетки инкубировали 7 суток во флаконах, покрытых изучаемыми белками, после чего сменяли среду и продолжали культивирование до образования колоний. Удаляемую при смене среду с неприкрепленными клетками переносили в новые флаконы с тем же покрытием и инкубировали в течение 7 суток (костный мозг) или 5 суток (зародышевая печень), после чего культуры фиксировали для подсчета колоний.

При исследовании адгезии миогенных клеток зародышевой печени к белкам внеклеточного матрикса их культивировали 10-12 суток в среде DMEM на 12-луночных платах с соответствующим покрытием и анализировали число миотуб, образуемых клетками, прикрепившимся за первые 7 суток инкубации.

Для анализа сроков адгезии миогенных предшественников к субстрату суспензию клеток зародышевой печени помещали в 12-луночную плату без белкового покрытия и культивировали в среде DMEM с 10% сыворотки плодов коровы в течение 1, 5 или 24 ч, после чего переносили в плату, покрытую фибронектином, а в исходную плату с прикрепившимися клетками

92

добавляли свежую среду. Через 7 суток в обеих платах проводили смену среды и культивировали клетки еще 3 суток с последующим подсчетом образовавшихся миотуб.

2.4. Обработка клеток 5-фторурацилом

Чувствительность стромальных клеток к 5-ФУ (Sigma) определяли путем их обработки препаратом *in vitro* (инкубация 10×10^6 клеток/мл в среде α -МЕМ с 10% сыворотки плодов коровы с добавлением 50 мкг/мл 5-ФУ или без него в течение 2 ч при 37°С, отмывка трехкратным центрифугированием) или *in vivo* (внутрибрюшинное введение 5-ФУ крысамдонорам в дозе 150 мг/кг за 1 сутки до выделения клеток; контроль – крысы, не получившие инъекции) с последующим культивированием в стандартных условиях.

2.5. Индукция дифференцировки МСК in vitro

Остеогенез и адипогенез. Клетки рассевали в 12-луночные платы с плотностью $1x10^4$ клеток/мл в остеогенную среду (α -MEM с 5% сыворотки плодов коровы с добавлением 10^{-8} M дексаметазона (Sigma), 50 мкг/мл 2-фосфо-L-аскорбата натрия (Fluka, Германия) и 10 мМ β -глицерофосфата натрия (Sigma)) либо с плотностью $3x10^4$ клеток/мл в адипогенную среду (α -MEM с 10% сыворотки плодов коровы с добавлением 10^{-6} M дексаметазона, 0,2 мМ индометацина, 0,01 мг/мл инсулина и 0,5 мМ IBMX (все – Sigma)). При изучении влияния факторов роста на остеогенез в среду дополнительно включали 2,5 нг/мл bFGF человека (Sigma) либо 100 нг/мл рекомбинантного BMP-2 человека (Peprotech, CША). Контролем к остеогенезу служили клетки, культивируемые в среде α -MEM с 5% сыворотки, к адипогенезу – в α -MEM с 10% сыворотки. Клетки культивировали с индукторами в течение 12-21 суток, меняя среду дважды в неделю.

Хондрогенез. Дифференцировку индуцировали в микромассовой культуре в бессывороточной среде. Суспензию, содержащую $2x10^5$ - $1x10^6$ клеток, центрифугировали 5 мин при 1000 об./мин в конических пластиковых пробирках объемом 15 мл типа Falcon (Greiner). Осадок ресуспендировали в 0,5 мл хондрогенной среды (DMEM с добавлением 10 нг/мл TGF- β 1 человека, 1% ITS+1, 10-⁸ M дексаметазона, 40 мкг/мл L-пролина (все – Sigma), 50 мкг/мл 2-фосфо-L-аскорбата натрия (Fluka) и 100 мкг/мл 0,1 M раствора пирувата натрия (HyClone)) и вновь осаждали центрифугированием. В некоторых экспериментах в среду включали также 100 нг/мл BMP-2. Контролем служили микромассовые культуры в среде того же состава, но без TGF- β 1 и BMP-2. Клетки культивировали в пробирках в течение 21 суток, меняя среду дважды в неделю.

Миогенез. Были использованы несколько протоколов индукции:

1) Клетки культивировали на пластике, фибонектине или ламинине в среде DMEM с 10% сыворотки плодов коровы и 10 мкМ 5-азацитидина (Sigma) (в некоторых случаях с добавлением 10 нг/мл bFGF) в течение 24 ч, после чего среду заменяли на DMEM с 10% сыворотки без 5азацитидина и культивировали еще 14-19 суток с еженедельной сменой среды.

2) Клетки культивировали 24 ч на пластике в среде DMEM с добавлением 2% сыворотки плодов коровы, 10 нг/мл EGF мыши, 10 нг/мл PDGF человека (все – Sigma), 1% ITS+1, 50 мкг/мл 2-фосфо-L-аскорбата натрия и 3 мкМ 5-азацитидина, либо на фибронектине в среде того же состава, но с 10 нг/мл bFGF вместо PDGF. Далее культивирование продолжали в той же среде без 5-азацитидина в течение 11-14 суток.

3) Клетки культивировали 7 суток на фибронектине в среде DMEM с 10% сыворотки плодов коровы, добавляя 50% среды того же состава, кондиционированной первичной культурой клеток из скелетных мышц 17-суточных зародышей крысы. Для исключения контаминации исследуемой культуры клетками из мышц кондиционированную ими среду пропускали через фильтрующую насадку на шприц с диаметром пор 0,22 мкм (Millipore, США)

2.6. Совместное культивирование различных клеточных популяций

Для оценки влияния факторов, секретируемых МСК костного мозга, на остеогенную дифференцировку МСК зародышевой печени, клетки на 1-м пассаже культивировали 14-17 суток в остеогенной среде в 6-луночных платах (Greiner), разделяя изучаемые популяции мембранными вкладышами с диаметром пор 0,4 мкм (Becton Dickinson, Франция). Клетки зародышевой печени помещали на дно лунки, а клетки костного мозга, служащие источником гуморальных регуляторов, на поверхность вкладыша. Аналогичным образом с целью индукции миогенной дифференцировки МСК зародышевой печени их сокультивировали с миобластами линии C2C12 из регенерирующих скелетных мышц половозрелой мыши [Bains et al., 1984] в среде DMEM с 10% сыворотки плодов коровы. МСК помещали на дно лунки, покрытое фибронектином, а миобласты – на вкладыш. Через 7 суток среду сменяли на DMEM с 5% сыворотки, общее время культивирования составляло 10 суток.

2.7. Культивирование МСК на носителях

В качестве носителей для культивирования и трансплантации МСК были протестированы коммерчески доступные биоматериалы на основе костного матрикса «Остеопласт-М» и «Остеопласт-Т» (НПК «Витаформ-Р», Россия) и коллагеновая гемостатическая губка (ОАО «Лужский завод "Белкозин"», Россия), а также полимерные криогели из коллагена, агарозы (в том числе с привитыми алкильными группами или желатиной), смеси агарозы с желатиной и диметилакриламида, изготовленные и любезно предоставленные В.И. Лозинским (Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН), и коллаген-хитозановая матрица, разработанная ГОУ ВПО "Красноярская государственная медицинская академия" МЗ РФ [Большаков и др., 2005 а, б].

Полукруглые фрагменты криогелей и коллаген-хитозановой матрицы диаметром 1,6-1,7 мм и блоки «Остеопласта-М» и «Остеопласта-Т» размером 5х5х5 мм помещали в лунки 12луночных плат и заливали взвесью МСК в среде α-МЕМ с 10-15% сыворотки плодов коровы либо погружали в лунки, заполненные взвесью клеток. В ряде опытов в первые 0,5–2 ч плату с носителями и клетками покачивали вручную или на шейкере для предотвращения адгезии клеток к пластику и улучшения их проникновения в поры носителя. Длительность культивирования составляла от 2 ч до 28 суток, среду меняли один - два раза в неделю.

3. Эксперименты in vivo

3.1. Эктопическая трансплантация печени зародышей

Половозрелым самкам крыс под нембуталовым наркозом помещали в надрез почки 2–3 печени 14-суточных зародышей крысы, печень 16-суточного зародыша либо фрагмент печени 20-суточного зародыша. Трансплантаты с окружающей почечной тканью фиксировали через 7, 13, 14 или 35 суток после операции.

3. 2. Трансплантация клеток в диффузионных камерах

В диффузионные камеры (Millipore) вносили в 100 мкл среды α-MEM 1x10⁸ свежевыделенных клеток костного мозга или зародышевой печени крысы либо 1x10⁶ клеток, размноженных *in vitro* в течение 1 - 4 пассажей. Камеры с клетками трансплантировали по 4 - 5 штук в перитонеальную полость половозрелых самцов крыс и извлекали для фиксации через 35, 42 или 49 суток.

3.3. Трансплантация клеток на носителях

Фрагменты носителей с культивируемыми на них клетками либо контрольные образцы тех же материалов без клеток трансплантировали половозрелым самкам крыс в разрез почки

или под кожу. В ряде экспериментов носители (гемостатическую губку, коллаген-хитозановую матрицу, «Остеопласт-М») загружали клетками непосредственно перед трансплантацией, нанося концентрированную клеточную суспензию на сухой материал. Трансплантаты фиксировали через 21 – 70 суток после операции.

4. Анализ результатов

4.1. Морфологические исследования

Тотальные препараты. Монослойные культуры фиксировали 96⁰-ным спиртом и окрашивали азур-эозином. Микромассовые культуры в хондрогенной среде фиксировали 4%ным формалином, окрашивали гематоксилином, толуидиновым синим или альциановым синим, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в бальзам, раздавливая покровным стеклом.

Парафиновые срезы. Для гистологического анализа 14-суточные зародыши крысы, печень и селезенку на разных стадиях развития, а также трансплантаты зародышевой печени фиксировали смесью Карнуа, а бедренные кости 20-суточных плодов и половозрелых крыс, диффузионные камеры и носители – смесью Ценкера. Материал заливали в парафин, получали срезы толщиной 5 мкм и окрашивали их гематоксилин-эозином или азур-эозином.

Криостатные срезы. Микромассовые культуры МСК и печень зародышей фиксировали 4%-ным параформальдегидом на 0,1 М PBS в течение 1 суток, выдерживали сутки в 20%-ном растворе сахарозы и замораживали в парах азота, после чего хранили при -70⁰ С. На криостате получали срезы толщиной 5-7 мкм и использовали их для иммуногистохимического анализа.

4.2. Цитохимические исследования

Для оценки активности ЩФ проводили реакцию азосочетания прочного краснофиолетового FRV с нафтолом AS-BI согласно протоколу фирмы-производителя (Sigma). Соли Ca²⁺ выявляли путем окрашивания культур ализариновым красным S (Sigma) при pH 4,1, включения нейтральных жиров – окрашиванием смесью суданов III и IV на 70⁰-ном спирте или жировым красным O (Sigma) [Пирс, 1962]. Ядра докрашивали гематоксилином. Гликозаминогликаны хрящевой ткани визуализировали с помощью окрашивания альциановым синим на 3 %-ной уксусной кислоте или толуидиновым синим на 30⁰-ном спирте.

4.3. Иммуноцитохимические исследования

Культуры фиксировали 4%-ным формалином на PBS, пермеабилизировали 0,25%-ным раствором тритона X-100 (Fluka) на PBS с добавлением 0,1% твина 20 (Ferak, Германия) и блокировали неспецифическое связывание антител 3%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА, Sigma) на PBS с 0,1% твина 20. Иммуноцитохимические реакции проводили с применением моноклональных антител мыши к CD73 (BD Pharmingen, CША), CD106 (BioLegend, CША), CD90, MyoD, миозину 2 типа, м-кадгерину, десмину, рилину (все - Abcam, Великобритания), панцитокератину (Sigma), цитокератину-19 (Millipore), остеокальцину (QED Bioscience, США), коллагену II типа (Chemicon, США), антител кролика к цитокератину-18, Myf5 (все - Lifespan Biosciences, США), CD144 и белку адипоцитов, связывающему липиды (ALBP), а также меченных ФИТЦ антител кролика к Ki-67 (все - Abcam). Антиген Ki-67 выявляли методом прямого иммунофлуоресцентного окрашивания, остальные - методом непрямой иммунофлуоресценции, используя вторые антитела, меченные флуорохромом Alexa Fluor 488 или Alexa Fluor 568 (Invitrogen, США). Ядра окрашивали Hoechst 33342 (Sigma) или DAPI (Vector, США). Специфичность используемых антител при прямом окрашивании подтверждали с помощью контрольной реакции с меченными ФИТЦ изотипическими антителами кролика (Abcam), при непрямом – с помощью контрольной реакции без первых антител. Флуоресценцию анализировали под микроскопом Leica DM RXA2 (Германия).

4.4. Выявление никотиновых холинорецепторов с помощью α-бунгаротоксина

Никотиновые холинорецепторы на миотубах выявляли по их способности к связыванию α -бунгаротоксина [Axelrod et al., 1976]. Меченный тетраметилродамином α -бунгаротоксин из яда *Bungarus multicinctus* (Sigma) добавляли к изучаемым культурам в концентрации 10⁻⁶ М на 30 мин при 37⁰ С. По окончании инкубации клетки отмывали раствором Хэнкса с 2 мг/мл БСА 30 мин при 37⁰ С и трижды - раствором Хэнкса без БСА, фиксировали 4%-ным формалином на PBS и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа.

4.5. Молекулярно-генетический анализ

Для молекулярно-генетических исследований были использованы TRI® Reagent (Sigma); набор для синтеза первой цепи кДНК: обратная транскриптаза M-MLV (200 ед./мкл), буфер для обратной транскриптазы M-MLV, x10 (pH 8,3, 75мM Mg²⁺); олиго(дТ)15 праймеры (15 о.е./мл)

(Силекс М, Россия), смесь 1,5мМ dNTP, ДНКаза "Turbo" (2 ед./мкл) (Ambion, США); набор для амплификации ДНК: ColoredTaq полимераза (2,5 ед./мкл), буфер для ColoredTaq полимеразы, x10 (pH 8,6, 25мМ Mg²⁺), смесь 1,5мМ dNTP (Силекс М); маркер ДНК (Fermentas, Канада).

Тотальную РНК выделяли с помощью реактива TRI® Reagent по инструкции фирмыпроизводителя. кДНК синтезировали с использованием обратной транскриптазы M-MLV и олиго(дТ)15, предварительно обработав тотальную РНК ДНКазой Turbo для исключения контаминации геномной ДНК. ПЦР проводили на матрице кДНК с применением ColoredTaq полимеразы и специфических праймеров (Литех, Россия), сконструированных с помощью компьютерной программы DNAStar (США) и международной базы данных NCBI (США), на амплификаторе Eppendorf Mastercycler (Германия). Предварительно кДНК нормировали по GAPDH. Нуклеотидные последовательности использованных праймеров приведены в таблице 1. Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 1%-ном агарозном геле с бромистым этидием (Sigma), интенсивность их свечения оценивали на УФ-трансиллюминаторе (BIO-RAD, США) с помощью программы QuantityOne (BIO-RAD).

Название гена	Нуклеотидная последовательность праймеров	Размер продукта ПЦР, н.п.	Число циклов ПЦР реакции
GAPDH	5' tacaacctccttgcagctcc 3'	378	30
	5'ggatcttcagaggtagtctgtc 3'		
CD90	5' gaacccagtcatcagcatcac 3'	496	30
	5' gggcccaaccagtcacagag 3'		
CD73	5'ccgggggccactagcacctca 3'	401	30
	5'ggcctggaccacgggaacctt 3'		
CD105	5'tccagctgcggcatgaaagtgaca 3'	553	35
	5'gagcagggccccaatgaggaagg 3'		

Таблица 1. Праймеры, использованные для ПЦР-анализа

4.6. Количественный анализ и статистическая обработка результатов

Эксперименты с клеточными культурами повторяли по 2–5 раз, используя в каждом опыте клетки от 5–47 зародышей или от 2-5 половозрелых животных; в экспериментах по трансплантации число реципиентов составляло, как правило, 3-10 на вариант.

Эффективность клонирования МСК определяли подсчетом колоний, содержащих не менее 50 клеток, и выражали как число КОЕ-Ф на 1x10⁶ посаженных клеток. Пролиферативную активность клеток в пассируемых культурах оценивали по доле клеток с положительной реакцией на Ki-67, определяемой путем подсчета окрашенных ядер под микроскопом в 20-27 полях зрения. Выраженность остеогенеза определяли по площади областей с положительной

реакцией на Щ Φ или Ca²⁺, измеренной на отсканированных изображениях лунок с помощью программы ImageJ [Abramoff et al., 2004]. Для количественного анализа адипогенной дифференцировки подсчитывали клетки с жировыми включениями в 3 случайных полях зрения каждой лунки; оценивали также численность скоплений, содержащих не менее 10 адипоцитов.

Данные обрабатывали статистически, пользуясь непараметрическим критерием Манна-Уитни и экспресс-методом статистической обработки с применением таблиц Стрелкова [Стрелков, 1999]. Уровень значимости принимали равным 0,05.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Характеристика клонального роста МСК в первичной культуре

Способность к образованию колоний-клонов *in vitro* – одна из основных характеристик МСК. Со времен Фриденштейна, впервые идентифицировавшего родоначальные клетки стромы как КОЕ-Ф [Friedenstein et al., 1976], клональный анализ широко применяется для определения содержания МСК в клеточных популяциях. Мы оценили эффективность клонирования стромальных клеток из органов гемопоэза, взятых как в период высокой кроветворной активности, так и на стадиях, характеризующихся отсутствием или слабой выраженностью кроветворения, и исследовали морфологию и фенотип образуемых этими клетками колоний.

1.1. Содержание клоногенных МСК в популяциях клеток кроветворных органов крысы и мыши в пре- и постнатальном онтогенезе

Клетки костного мозга половозрелых крыс и мышей, печени крысы и мыши на разных стадиях пре- и постнатального онтогенеза, а также селезенки половозрелых крыс или зародышей 20 суток развития, помещенные в первичную культуру с плотностью 0,9-1,1х10⁶ клеток/мл, формировали гетерогенные по величине дискретные колонии, состоящие преимущественно из фибробластов. Эффективность клонирования КОЕ-Ф из этих источников, определенная как число колоний, образовавшихся через 6-12 суток роста культуры в пересчете на 1 млн посаженных клеток, представлена в таблице 2. Как показал гистологический анализ соответствующих органов на предмет кроветворной активности (рисунок А.1), относительное содержание КОЕ-Ф в полученных из них клеточных суспензиях в целом коррелировало с выраженностью гемопоэза на данной стадии развития. Исключение составляла культура клеток бедренной кости 20-суточных зародышей крысы, содержащей зачаток костного мозга с небольшим числом кроветворных клеток. При посеве клеток из этого источника с плотностью 1-2x10⁵ клеток/мл культура уже на следующие сутки содержала равномерно расположенные веретеновидные или распластанные фибробласты. Через 3 суток после посева они скоплениями формировали субконфлюэнтный монослой с немногочисленными мультилокулярных адипоцитов и плотными узелками базофильных клеток, интенсивно окрашивающихся на ЩФ (вероятно, очагами спонтанного остеогенеза) (рисунок 1 а-в). Образование дискретных колоний требовало посева с плотностью 1-4x10³ клеток/мл (рисунок 1

г).

Источник клеток Эффективность Доля колоний, содержащих ЩФ+ клетки, % клонирования, ≤50% ЩФ+ >50% ЩФ+ Неокрашенные КОЕ-Ф на клеток клеток 1 млн клеток Зрелый 39,29±3,66% 51,49±1,91% 9,23±1,91% $16,00\pm1,19$ костный мозг 20,53±4,58% 75,18±6,15% 16,77±1,13 4,29±3,83% 69,67±6,15% 13.11±0.89 5,68±0,58% 24,65±6,04% $10,16\pm0,23$ Кость 20-5515,88±1211,51 95,28±1,10% 4,60±0,97% $0,12\pm0,13\%$ суточных 4708,33±342,13 99,41±0,63% 0,59±0,63% $0.12\pm0.13\%$ зародышей 9819,44±862,75 93,00±1,08% $2,57\pm0,67\%$ 4,43±0,78% Печень 14-6,96±0,80 84,61±2,98% 15,39±2,98% $0,00\pm12,37\%$ суточных 6.50 ± 1.52 94,45±2,73% $5,45\pm2,73\%$ $0.00 \pm 12.37\%$ 24,38±2,11 95,43±1,75% 4,57±1,75% $0.00 \pm 12.37\%$ зародышей Печень 16- 14.67 ± 1.59 77.64±8.77% 22.14±9.06% 0.73±0.64% суточных 90,94±4,20% 9,06±4,20% 0,00±16,33% 4,67±0,51 зародын. У Печень 20- $24,26\pm2,24$ $16,16\pm1,21$ 5,31±1,10 95,35±1,33% 4,65±1,33% $0,00\pm 9,05\%$ суточных $3,78\pm0,62$ 97,53±2,15% 2,47±2,15% 0,00±12,37% 0,00±12,37% зародышей $1,26\pm0,09$ 89,50±6,45% 10,50±6,45% 72,91±9,00% 24,69±9,00% $2,39\pm1,13\%$ Зрелая печень $4,18\pm1,26$ $0,008 \pm 0,010$ 0,00±16,33 0.00 ± 14.09 Селезенка 20-73,22±2,37% $12,48\pm0,60$ 25,74±2,69% 1,04±0,58% суточных 22,86±3,39 18,09±4,05% 76,80±2,42% 5,11±4,45% 45,93±9,41% 54,07±9,41% зародышей 18,69±0,94 0,00±11,02% 93,28±2,58% 6,72±2,58% $0,00\pm12,37\%$ Зрелая $2,97\pm0,58$ селезенка 9,25±1,51 71,06±4,78% 27,70±4,79% $1,24\pm0,62\%$ 5,73±1,89 83,32±5,63% 16,19±5,63% $0,48\pm0,52\%$ Зрелый $21,44\pm0,41$ $11,43\pm10,12\%$ 61,43±12,64% $27,14\pm2,53\%$ 20,28±0,46 8,81±2,04% 57,96±4,35% 33,24±4,61% костный мозг $21,26\pm1,50$ $18,48\pm2,35$ $0.00 \pm 11.02\%$ Печень 14- 7.96 ± 0.51 94,72±4,43% 5,28±4,43% суточных MbIIIIb зародышей Печень 17 -36,28±0,53 68,35±5,55% $4,90\pm 2,00\%$ 26,75±3,55% суточных зародышей Печень на 2-е 7,08±0,23 66,67±28,10% 33,33±28,10% $0.00 \pm 14.09\%$ сутки после рождения

Таблица 2. Эффективность клонирования КОЕ-Ф и активность щелочной фосфатазы в образуемых ими колониях



Рисунок 1. Первичная культура клеток кости 20-суточных зародышей крысы через 3 суток после посева с плотностью $2x10^5$ клеток/мл (a - b) и через 8 суток после посева с плотностью $1x10^3$ клеток/мл (z). a - монослой фибробластов, окрашивание азур-эозином; <math>6 -кластер адипоцитов, окрашивание жировым красным O и гематоксилином; b -предполагаемый очаг остеогенеза, цитохимическая реакция на ЩФ, докрашивание гематоксилином; r -клония фибробластов, окрашивание азур-эозином. Увел.: об. x4, ок. x10 (a, b, z); об. x 20, ок. x10 (b).

Вероятно, крайне высокая эффективность клонирования КОЕ-Ф из кости плода связана с тем, что, в отличие от остальных изучаемых органов, в которых преобладают кроветворные клетки, не дающие стромальных колоний, кость до начала активного гемопоэза содержит в основном механоциты и лишь малую долю кроветворных клеток. В образование колоний клетками этого органа вносит вклад не только зачаток костного мозга, но также и кость, хрящ, надкостница, а возможно, и примесь клеток окружающих тканей (сухожилий, мышц, суставной сумки). По данным литературы, они также содержат МСК [Ghilzon et al., 1999; Noth et al., 2002; Nathan et al., 2003; Mirmalek-Sani et al., 2006; Yoshimura et al., 2007; Tan et al., 2012]. Кроме того, для МСК костного мозга человека было показано, что в пренатальный период онтогенеза эффективность их клонирования превышает таковую в постнатальный [Zhang et al., 2009].

Динамика численности КОЕ-Ф в остальных изученных органах, характеризующаяся высоким их содержанием в период активного гемопоэза и значительно меньшим в период затухания кроветворения, в общих чертах согласуется с отмеченной в других работах [Van Den

Heuvel et al., 1987; Wolf et al., 1995] и может быть косвенным свидетельством миграции МСК в ходе онтогенеза для создания кроветворного микроокружения. Впрочем, нельзя исключить, что снижение числа КОЕ-Ф в печени и селезенке по завершении активного гемопоэза вызвано их гибелью или терминальной дифференцировкой с потерей клоногенной способности, причиной чего могут быть изменения в продукции цитокинов или в составе внеклеточного матрикса.

1.2. Морфология и клеточный состав колоний, образуемых КОЕ-Ф

Колонии, образуемые КОЕ-Ф костного мозга крысы, сильно различались по размеру и были, как правило, достаточно рыхлыми, хотя встречались и очень плотные. Наиболее крупные из них часто имели ячеистую структуру из-за неодинаковой плотности расположения клеток. Колонии состояли в основном из вытянутых или отростчатых фибробластов (рисунок 2 а), в некоторых экспериментах были выявлены единичные колонии с признаками спонтанной адипогенной дифференцировки большинства клеток (рисунок 2 б). Макрофаги и другие кроветворные клетки в составе колоний были малочисленны или отсутствовали.

В культурах клеток из **бедренной кости 20-суточных зародышей крысы** также преобладали рыхлые колонии, обычно небольшие, однако встречались также более крупные и компактные. Клетки колоний располагались достаточно равномерно, без значительных сгущений, и представляли собой преимущественно узкие, вытянутые фибробласты, хотя в некоторых колониях присутствовали и крупные, сильно распластанные клетки (рисунок 2 г).

Колонии, образуемые КОЕ-Ф печени зародышей крысы 14 и 16 суток развития (рисунок 2 в, г) отличались от образуемых клетками зрелого костного мозга более плотным и равномерным расположением клеток, а также разнообразием их морфологии. Помимо узких фибробластов, иногда с включениями жира, в этих культурах встречались более распластанные фибробластоподобные клетки, а также очень крупные, иногда двуядерные клетки с морфологией миофибробластов и плотные колонии округлых или полигональных черепицеобразных клеток [Паюшина и др., 2011]. Часто отмечались митозы. Некоторые культуры, особенно от 14-суточных зародышей, содержали примесь макрофагов. В культуре печени 20-суточных плодов крысы преобладали небольшие рыхлые колонии из 50-100 клеток типичной фибробластоподобной или сильно распластанной формы, иногда с вакуолями в цитоплазме (рисунок 2 д). Часто отмечалась примесь кроветворных клеток. Клетки из печени половозрелых крыс обычно образовывали лишь единичные колонии или кластеры либо не образовывали их вовсе. Однако в одном из опытов было отмечено формирование множественных колоний, в том числе крупных около 1000 клеток) и плотных, состоящих из типичных фибробластов (рисунок 2 е).

Культуры селезенки 20-суточных зародышей крысы (рисунок 2 ж) или половозрелых крыс (рисунок 2 з) были в целом сходны с полученными из печени 14- или 16-суточных зародышей: в них преобладали компактные, однородные по плотности колонии вытянутых или отростчатых фибробластоподобных клеток различной величины и степени распластанности. Иногда наряду с фибробластами в составе колоний присутствовали округлые или полигональные клетки без отростков, расположенные менее плотно, чем в культурах зародышевой печени (рисунок 2 ж). Существенных морфологических различий между колониями, происходящими из КОЕ-Ф зародышевой и зрелой селезенки, отмечено не было.

Некоторые различия в морфологии колоний, образуемых КОЕ-Ф зрелого костного мозга и развивающейся печени, были выявлены и при изучении культур клеток мыши. Так, в культуре зрелого костного мозга колонии были гетерогенными по размеру и, как правило, рыхлыми. Они состояли в основном из вытянутых или отростчатых фибробластов с примесью эпителиоидных клеток и молодых гранулоцитов (рисунок 3 а). КОЕ-Ф печени 14-суточных зародышей мыши образовывали обычно мелкие рыхлые колонии с нечеткими границами. Фибробласты в их составе были, как правило, крупными, плоскими, с большими рыхлыми ядрами (рисунок 3 б). В культурах клеток печени 17-суточных зародышей большинство колоний имели рыхлую сетчатую структуру, были более крупными и оформленными, чем в случае более ранних зародышей, и содержали больше веретеновидных или отростчатых фибробластов, подобных таковым в культуре костного мозга (рисунок 3 в), хотя распластанные клетки также были многочисленны. Как и в культурах зародышевой печени крысы, изредка миофибробластоподобные клетки, часто двуядерные или многоядерные, и встречались колонии черепицеобразных клеток. Колонии КОЕ-Ф печени мышей на 2-е сутки постнатального развития, подобно полученным из печени 14-суточных зародышей, были мелкими, рыхлыми, с трудноопределимыми границами, и состояли в основном из крупных плоских клеток (рисунок 3 г), хотя изредка встречались и колонии более мелких фибробластов типичной морфологии.

Общей чертой культур стромальных клеток как костного мозга, так и развивающейся печени мыши, отличающей их от полученных из кроветворных органов крысы, было присутствие в колониях и между ними множества макрофагов. В культурах зрелого костного мозга и печени 17-суточных зародышей они обычно составляли около половины от общего числа клеток колонии, а в культурах печени на более ранних или поздних сроках развития часто бывали многочисленнее фибробластов. Нередко встречались и гранулоциты, расположенные поодиночке или мелкими группами. О значительной контаминации культур MCK мыши кроветворными клетками сообщают и другие авторы [Горская и др., 1976; Wang, Wolf, 1990; Phinney et al., 1999 a; Soleimani et al., 2009]; есть данные, что в колониях, образуемых КОЕ-Ф

104



Рисунок 2. Колонии, образованные КОЕ-Ф крысы: а, б - из костного мозга; в - из печени 14-суточных зародышей; r - из печени 16-суточных зародышей; d - из печени 20-суточных зародышей; e - из печени половозрелых крыс; ж - из селезенки 20-суточных зародышей; s - изселезенки половозрелых крыс. Окрашивание: а, в, r, d, s - азур-эозин, $\delta - судан$ III и IV, докрашивание гематоксилином, e, ж - гематоксилин. Увел.: об. x4, ок. x10 (a, b, b, r, d, e, w, s); об. x 10, ок. x10 (d).



Рисунок 3. Колонии, образованные КОЕ-Ф мыши: а – из костного мозга; б – из печени 14-суточных зародышей; в – из печени 17-суточных зародышей; е – из печени мышей после 2 суток постнатального развития. Окрашивание: а, б - азур-эозин; в, г - судан III и IV, докрашивание гематоксилином. Увел.: об. х 10, ок. х10.

этого вида животных, макрофаги преобладают над стромальными клетками клонального происхождения [Perkins, Fleischman, 1990]. По этой причине, а также в связи с отмечаемым рядом исследователей плохим ростом МСК мыши в стандартных условиях культивирования [Phinney et al., 1999 a; Peister et al., 2004; Sun et al., 2003], в большинстве последующих экспериментов мы использовали клетки, полученные от крысы.

Таким образом, колонии, образуемые КОЕ-Ф различных кроветворных органов крысы и мыши, были в целом сходны по морфологии, однако имели и некоторые различия в зависимости от видовой и органной принадлежности. У крысы они состояли преимущественно из фибробластов, причем колонии, полученные из печени в период активного гемопоэза (в меньшей степени – из селезенки) характеризовались более разнообразной морфологией клеток и более компактным их расположением, чем в культурах костного мозга. Особенностью культур стромальных клеток мыши являлось присутствие большого количества макрофагов.

1.3. Сравнительная оценка остеогенных потенций КОЕ-Ф из кроветворных органов в ходе онтогенеза на основании активности щелочной фосфатазы в клетках колоний

Активность ЩФ характерна для клеток, способных дифференцироваться в остеобласты. Этот фермент, появляющийся на ранних стадиях костной дифференцировки, широко

106

применяется как маркер остеогенных клеток [Owen et al., 1987; D'Ippolito et al., 1999; Walsh et al., 2001; Atmani et al., 2003; Sogo et al., 2007]. Показано, что в костном мозге человека ЩФ присутствует в наиболее зрелой субпопуляции МСК с высокими остеогенными потенциями и ограниченной способностью к другим направлениям дифференцировки [Kim et al., 2012 c]. Мы использовали цитохимическое выявление ЩФ для сравнительной оценки остеогенных потенций КОЕ-Ф из печени, селезенки и костного мозга на разных стадиях онтогенеза.

Как можно видеть из таблицы 2, в культурах КОЕ-Ф печени как крысы, так и мыши на всех изученных сроках развития лишь немногие колонии содержали ЩФ. Отдельные фибробластов фибробласты или группы co слабой или умеренной реакцией, свидетельствующей о невысокой активности фермента, обычно присутствовали только в крупных колониях. Доля их в составе колонии была, как правило, небольшой; колонии со значительным числом ЩФ⁺ клеток встречались редко. При сравнении активности ЩФ в культурах клеток от зародышей разных сроков развития следует отметить, что выраженность реакции, как правило, была выше в колониях, полученных из печени на стадии активного кроветворения [Паюшина и др., 2011]. Так, в культуре печени 16-суточных зародышей крысы (рисунок 4 б) колонии часто содержали достаточно крупные скопления клеток с реакцией той или иной интенсивности; в некоторых колониях такие клетки преобладали. Колонии, образованные КОЕ-Ф печени 14-суточных зародышей (рисунок 4 а), содержали единичные фибробласты с положительной реакцией или группы из нескольких подобных клеток; яркость реакции в них варьировала, будучи в некоторых случаях сопоставимой с таковой в клетках от 16-суточных зародышей. В колониях, полученных из печени 20-суточных плодов (рисунок 4 в), отмечено лишь слабое окрашивание единичных клеток или их мелких групп. Тенденция к зависимости остеогенных потенций КОЕ-Ф от активности гемопоэза в печени отмечалась и при анализе клеток мыши: в культурах от 14-суточных зародышей или животных на 2-е сутки постнатального онтогенеза слабая реакция была выявлена лишь в единичных фибробластах или их мелких группах, тогда как в культурах клеток из активно кроветворящей печени 17суточных зародышей (рисунок 4 г) встречались колонии, окрашенные полностью или большей частью, иногда с высокой интенсивностью.

В культурах **селезенки** зародышей крысы колоний, содержащих окрашенные на ЩФ клетки, было больше, чем в культурах развивающейся печени, однако и в этом случае такие клетки обычно составляли меньшинство в составе колонии, а реакция имела слабую, реже - умеренную интенсивность. При этом фермент выявлялся не только в клетках с морфологией фибробластов, но иногда также и в округлых клетках без отростков (рисунок 4 д). В культурах селезенки половозрелых крыс окрашенные на ЩФ колонии были редки.



Рисунок 4. Активность ЩФ в колониях, происходящих из КОЕ-Ф: а - печени 14суточных зародышей крысы; б – печени 16-суточных зародышей крысы; в – печени 20суточных зародышей крысы; г - печени 17-суточных зародышей мыши; д – селезенки 20суточных зародышей крысы; е – бедренной кости 20-суточных зародышей крысы; ж – костного мозга крысы; з – костного мозга мыши. Ядра докрашены гематоксилином. Увел.: об. х4, ок. х10 (а, в, г, д, е, з); об. х10, ок. х10 (б, ж).
Малая доля колоний, экспрессирующих Щ Φ , и невысокая интенсивность реакции были характерны и для культур КОЕ- Φ кости 20-суточных зародышей крысы. Хотя в культурах клеток из этого источника, посеянных с плотностью 1–2х10⁵ клеток/мл, некоторые компактные скопления клеток (предполагаемые очаги спонтанного остеогенеза) ярко окрашивались на Щ Φ (рисунок 1 в), в колониях, образующихся при посеве с низкой плотностью, лишь изредка встречались слабо или умеренно окрашенные фибробласты и их мелкие группы (рисунок 4 е).

Иная картина наблюдалась в культурах клеток **зрелого костного мозга** обоих видов животных. Доля колоний, содержащих ЩФ, была в них намного выше, чем в культурах, полученных из остальных источников. Фермент отсутствовал обычно лишь в мелких колониях и в кластерах менее чем из 50 фибробластов. Остальные колонии почти всегда содержали ту или иную долю клеток с положительной реакцией, причем многие были окрашены полностью или почти полностью (рисунок 4 ж, 3). Интенсивность реакции варьировала как между колониями, так и между клетками в пределах одной колонии, и часто бывала высокой.

Очевидно, обилие клеток с положительной реакцией на ЩФ, свидетельствующей об остеогенных потенциях, среди МСК костного мозга обусловлено их функциональной ролью в качестве предшественников остеобластов и отражает потребность костной ткани в физиологической и репаративной регенерации. С этой точки зрения объяснима малочисленность подобных клеток в печени и селезенке, где остеогенез в норме отсутствует. В то же время экспрессия ЩФ лишь немногими клетками из кости зародыша - весьма неожиданный факт, учитывая активное замещение хрящевой ткани костной в завершающий период прентального онтогенеза. Однако сходные данные были получены и другими авторами, обнаружившими значительно меньшую долю колоний, содержащих ЩФ, в культуре КОЕ-Ф костного мозга от новорожденных мышей по сравнению с половозрелыми [Van Den Heuvel et al., 1991 a]. Не исключено, что образование костной ткани в конечности плода обусловлено дифференцировкой не столько клоногенных МСК, сколько более зрелых предшественников (ответственных, видимо, и за спонтанный остеогенез, отмеченный нами в первичной культуре кости зародышей уже через 3 суток после посева клеток). Оценивая полученные данные, следует иметь в виду и активный гемопоэз в зрелом костном мозге в отличие от пренатального. Возможно, выраженные остеогенные потенции его МСК связаны в том числе и с потребностью в клетках остеобластического ряда – важных составляющих кроветворного микроокружения в этом органе [Nelissen et al., 2000; Askmyr et al., 2009; Chitteti et al., 2010].

Некоторая зависимость содержания ЩФ в стромальных колониях от активности гемопоэза, могущая отражать изменение дифференцировочных потенций МСК, прослеживается и в популяции КОЕ-Ф зародышевой печени, но отсутствует в случае селезенки. Впрочем, в

постнатальном периоде селезенка грызунов, переходя преимущественно к лимфопоэзу, не прекращает миелоидного кроветворения полностью [Wolber et al., 2002] и, по-видимому, МСК в ней в какой-то мере продолжают участвовать в организации кроветворного микроокружения.

Таким образом, судя по активности ЩФ, наибольшее содержание остеогенных клеток было отмечено в популяции МСК зрелого костного мозга. Культуры стромальных клеток из остальных сравниваемых источников существенно уступали полученным из костного мозга по числу колоний, содержащих клетки с положительной реакцией на ЩФ, доле таких клеток в составе колонии и интенсивности реакции в них.

1.4. Антигенный фенотип клеток колоний: экспрессия маркеров МСК

Для фенотипической характеристики потомства КОЕ-Ф были избраны антигены CD73 и CD90, рекомендуемые Международным обществом клеточной терапии для идентификации MCK [Dominici et al., 2006]. Иммуноцитохимический анализ на третий рекомендуемый маркер, CD105, не был проведен ввиду отсутствия коммерчески доступных антител к этому антигену крысы. Еще одним использованным нами антигеном был CD106 (VCAM-1) - молекула адгезии, опосредующая регуляторные взаимодействия MCK с кроветворными клетками [Simmons et al., 1992; Gronthos et al., 2003]. Мы проанализировали присутствие этих антигенов на поверхности клеток первичных культур, полученных из всех изучаемых источников.

Клетки, несущие на поверхности **CD73** (рисунок 5), присутствовали в составе многих колоний в культурах зрелого костного мозга и зародышевой печени; в то же время значительная часть фибробластов этих колоний были лишены данного маркера. В культурах костного мозга половозрелых крыс и печени 16- и 20-суточных зародышей, доля клеток, экспрессирующих CD73, варьировала в широких пределах, составляя 25-60%. В колониях, полученных из печени 14-суточных зародышей, содержание таких клеток было существенно меньшим: как правило, оно не превышало 10%. В культурах кости 20-суточных плодов и печени 5-суточных крыс этот антиген отсутствовал либо выявлялся лишь на единичных клетках (не более 1% от общего числа). Отсутствовал он также и на клетках из зрелой селезенки, тогда как в некоторых, но не всех культурах селезенки зародышей обнаруживались содержащие его клетки, доля которых иногда достигала 50%.

СD90 (рисунок 6) экспрессировался с той или иной интенсивностью на 80-95% фибробластов колоний в культурах костного мозга половозрелых крыс, бедренной кости, печени и селезенки зародышей. Однако он отсутствовал на клетках из постнатальной печени и практически не выявлялся в культуре зрелой селезенки (в некоторых экспериментах была отмечена лишь крайне слабая реакция в единичных клетках).

CD106 (рисунок 7) был выявлен в культурах клеток из всех изученных источников, но лишь на отдельных фибробластах; подавляющее большинство клеток не содержали этого антигена. Так, в культурах зрелого костного мозга и кости плодов его несли приблизительно 10-15% клеток, в культурах зародышевой и зрелой селезенки – 6-7%, а в культурах печени их доля составляла около 15% у 14-суточных зародышей и 5-суточных крыс и не более 5% у зародышей 16 и 20 сут развития.

Экспрессия CD73 и CD90 в первичных культурах кости 20-суточных плодов, а также селезенки зародышей и половозрелых крыс была подтверждена также с помощью ПЦР-анализа; кроме того, данный метод был применен для выявления в культурах клеток из этих источников



Рисунок 5. Антиген CD73 в первичной культуре клеток кроветворных органов крысы: а – костного мозга половозрелых животных; б – бедренной кости 20-суточных зародышей; в – печени 14-суточных зародышей; г – печени 16-суточных зародышей; д – печени 20-суточных зародышей; е – печени 5-суточных животных; ж – селезенки 20-суточных зародышей; з – селезенки половозрелых животных. Непрямое иммунофлуоресцентное мечение с применением флуорохрома Alexa 488. a', б', в', г', d', e', ж', з' – совмещение изображения результата иммуномечения и ядер клеток, окрашенных DAPI (a', г') или Hoechst 33342 (б', в', d', e', ж', з').

мРНК CD105 (рисунок А.3). В стромальных клетках как зародышевой кости, так и селезенки на обеих изученных стадиях онтогенеза обнаружена выраженная экспрессия генов CD90 и CD105 на уровне, сопоставимом с таковым в пассируемой культуре MCK зрелого костного мозга.

Экспрессия гена CD73 клетками селезенки была более слабой; в культуре зародышевой кости его мРНК также выявлялась на низком уровне либо не выявлялась вообще, что в целом согласуется с данными иммуноцитохимического исследования. Ранее проведенный ПЦРанализ первичных культур печени зародышей крысы [Кожевникова и др., 2010] показал присутствие мРНК CD73, CD90 и CD105 в стромальных клетках от зародышей 14, 16 и 20 суток развития. При этом культуры от 14-суточных зародышей отличались от полученных на



Рисунок 6. Антиген CD90 в первичной культуре клеток кроветворных органов крысы: а – костного мозга половозрелых животных; б – бедренной кости 20-суточных зародышей; в – печени 14-суточных зародышей; г – печени 16-суточных зародышей; д – печени 20-суточных зародышей; е – печени 5-суточных животных; ж – селезенки 20-суточных зародышей; з – селезенки половозрелых животных. Непрямое иммунофлуоресцентное мечение с применением флуорохрома Alexa 488. a', б', в', г', д', е', ж', з' – совмещение изображения результата иммуномечения и ядер клеток, окрашенных DAPI (a', г') или Hoechst 33342 (б', в', д', е', ж', з').

последующих сроках эмбриогенеза пониженным содержанием мРНК CD73, возможно, в связи с тем, что на этой стадии кроветворная строма печени еще не достигает полного развития.

Таким образом, присутствие на клеточной поверхности антигенов CD73 и CD90, рекомендованных в качестве маркеров MCK, было характерно для активно кроветворящих органов, прежде всего костного мозга половозрелых животных и печени зародышей. При этом сопоставление доли CD73⁺ и CD90⁺ клеток указывает на существование в этих органах популяции, одновременно экспрессирующей оба антигена. Возможно, полученные данные отражают содержание в строме костного мозга и зародышевой печени множества клеток со свойствами MCK, организующих кроветворное микроокружение. Наличие CD106, по нашим наблюдениям, не зависело от активности гемопоэза в органе-источнике стромальных клеток на



Рисунок 7. Антиген CD106 в первичной культуре клеток кроветворных органов крысы: а – костного мозга половозрелых животных; б – бедренной кости 20-суточных зародышей; в – печени 14-суточных зародышей; г – печени 16-суточных зародышей; д – печени 20-суточных зародышей; е – печени 5-суточных животных; ж – селезенки 20-суточных зародышей; з – селезенки половозрелых животных. Непрямое иммунофлуоресцентное мечение с применением флуорохрома Alexa 488. a', б', в', г', д', е', ж', з' – совмещение изображения результата иммуномечения и ядер клеток, окрашенных Hoechst 33342). изучаемой стадии развития, несмотря на данные об участии этой молекулы в связывании кроветворных клеток со стромой [Simmons et al., 1992]. По некоторым сообщения, стромальные клетки, несущие CD106, более способны к адипогенезу и менее – к остеогенезу, чем лишенные этого маркера, и, возможно, представляют собой наименее зрелую субпопуляцию MCK [Boxall, Jones, 2012]. Нельзя также исключить кроветворное происхождение части клеток, содержащих CD106. Так, у мыши он обнаружен на миелоидных клетках костного мозга и селезенки [Ulyanova et al., 2005], а также на резидентных макрофагах зародышевой печени [Isern et al., 2008].

Таким образом, клоногенные стромальные клетки из исследуемых источников демонстрировали определенные различия не только в численности, но и в фенотипе. Так, в культуре КОЕ-Ф зрелого костного мозга, в отличие от полученных из остальных органов, преобладали колонии с активностью ЩФ, а клетки из постнатальной печени и зрелой селезенки не несли типичных для МСК поверхностных антигенов. В сочетании с данными об эффективности клонирования КОЕ-Ф это позволяет предположить, что число клеток с признаками МСК во всех трех органах максимально в период активного гемопоэза. Кроме того, в популяциях клеток из всех изученных источников отмечена значительная гетерогенность по морфологии, активности ШФ и иммунофенотипу не только между колониями, но и между клетками внутри колоний. Эти наблюдения согласуются с данными других авторов о различиях в свойствах МСК даже в пределах одного клона, возможно, под влиянием микроокружения, неодинакового в разных участках колонии [Van Den Heuvel et al., 1991 a; Bianco et al., 2001; Gregory et al., 2005]. В то же время отмеченная нами гетерогенность по экспрессии CD90 и особенно CD73 может говорить о том, что не все фибробластоподобные клетки первичной культуры являются МСК. Возможно, клетки колоний, неотличимые по морфологии от МСК, но лишенные характерных для них маркеров, представляют собой потомство МСК, терминально дифференцированное в фибробласты. Однако анализ этого вопроса затруднен отсутствием в литературе четких критериев для разграничения МСК и фибробластов [Haniffa et al., 2009].

2. Гетерогенность клеточного состава стромы зародышевой печени

Отбор по адгезии к пластику, позволивший Фриденштейну [Фриденштейн и др., 1970] отделить популяцию стромальных предшественников от остальных клеток кроветворных органов, в настоящее время остается основным методом выделения МСК из тканей [Dominici et al., 2006; Neuhuber et al., 2008; Okumura et al., 2009]. Однако способность прикрепляться к пластику не уникальна для МСК и в той или иной мере может быть присуща другим типам клеток. В связи с этим первичная культура, получаемая из различных источников данным

методом, может содержать примесь клеток, не имеющих отношения к МСК – кроветворных, эндотелиальных и других [Wang, Wolf, 1990; Phinney et al., 1999 a; Dominici et al., 2006; Mansuroglu et al., 2009]. Морфологическая гетерогенность первичных культур органов гемопоэза, могущая свидетельствовать о разнообразии их клеточного состава, была выявлена и в наших экспериментах. Ее степень была неодинакова для разных органов: если культуры костного мозга крысы состояли почти исключительно из фибробластов с небольшой примесью кроветворных и жировых клеток, то в культурах печени и селезенки встречались и клетки с иной морфологией. Наибольшим разнообразием отличались культуры клеток из печени зародышей: помимо колоний типичных фибробластов, в них встречались очень крупные, сильно распластанные миофибробластоподобные клетки, плотные колонии черепицеобразных клеток округлой или полигональной формы, а иногда и очаги спонтанного миогенеза. Морфологическая и иммунофенотипическая характеристика различных типов клеток в первичной культуре печени зародышей, направленная на выяснение их возможного происхождения и судьбы при субкультивировании, стала предметом наших исследований.

2.1. Миофибробласты

2.1.1. Морфология миофибробластоподобных клеток и экспрессия ими десмина

Клетки с морфологическими чертами миофибробластов – значительно крупнее типичных фибробластов, сильно распластанные, с одним или двумя большими рыхлыми ядрами и волокнистыми структурами в цитоплазме – присутствовали в первичной культуре печени от зародышей крысы всех изученных сроков развития – 14, 15, 16, 17 и 20 суток, а также от крыс на 3-5 сутки постнатального онтогенеза. Явной зависимости их числа от срока развития печени не отмечалось. Подобные клетки встречались как в составе стромальных колоний, располагаясь среди фибробластов поодиночке (рисунок 8 а) или группами (рисунок 8 б), так и вне колоний, иногда образуя кластеры величиной до 50 клеток (рисунок 8 в). Иногда, особенно в культурах печени 20-суточных зародышей, их окружали кроветворные клетки (рисунок 8 г).

Иммуноцитохимическое окрашивание первичных культур печени всех изученных сроков развития на белок промежуточных филаментов десмин, свойственный мышечным клеткам [Li, Capetanaki, 1993] и миофибробластам [Ramadori, Saile, 2002], выявило его в большинстве клеток с миофибробластоподобной морфологией (рисунок 9 а-г). При пассировании культур зародышевой печени содержание клеток с такой морфологией и экспрессия десмина варьировали от опыта к опыту: в одних случаях крупные клетки, содержащие десмин, выявлялись на 3-м пассаже (рисунок 9 д), в других – отсутствовали уже на

1-м (рисунок 9 е). В культурах костного мозга ни миофибробластоподобные клетки, ни десмин не обнаруживались.

2.1.2. Экспрессия специфических маркеров миофибробластов различного происхождения

Для выяснения природы выявленных миофибробластоподобных клеток мы провели



Рисчнок 8. Миофибробластоподобные клетки в первичной культуре печени зародышей крысы 14 (б), 16 (а) и 20 (в, г) суток развития: а – миофибробластоподобная клетка (указана стрелкой) в колонии фибробластов; б – миофибробластоподобных клеток группа в колонии фибробластов; в – кластер миофибробластоподобных клеток; справа внизу видна колония фибробластов; г – миофибробластоподобные в окружении клетки кроветворных (указаны стрелками). Окрашивание азурэозином. Увел.: об. x10, ок. x10 (a, б); об. x 4, ок. x10 (в); об. х20, ок. х10 (г).

иммуноцитохимический анализ на специфические маркеры двух гистогенетически не популяций родственных клеток печени – клеток Ито миофибробластов И соединительной ткани, окружающей сосуды желчные протоки И портальных триад. Миофибробластоподобная морфология и экспрессия десмина свойственны как Ито. клеткам при помещении в монослойную культуру переходящим в активированное состояние [Knittel et al., 1999; Kubota 2007], al., так et И миофибробластам перипортальной области

[Dudas

et

al.,

2007;

Ramadori, Saile, 2002], однако они могут быть различены по экспрессии рилина, являющегося маркером клеток Ито и отсутствующего в портальных миофибробластах [Kobold et al., 2002], и CD90, выявляемого в портальных миофибробластах, но не в клетках Ито [Dudas et al., 2007; 2009].

Окрашивание срезов печени 20-суточных плодов крысы на рилин показало его экспрессию клетками печеночных долек, форма и локализация которых были характерны для



Рисунок 9. Десмин в миофибробластоподобных клетках из развивающейся печени крысы: а – 14 суток эмбриогенеза, первичная культура; б – 16 суток эмбриогенеза, первичная культура; в – 17 суток эмбриогенеза, первичная культура; г – 5 суток постнатального онтогенеза, первичная культура; д – 14 суток эмбриогенеза, 3-й пассаж; е – 16 суток эмбриогенеза, 1-й пассаж. Непрямое иммунофлуоресцентное мечение с применением флуорохрома Alexa 488 (a, г–е) или Alexa 568 (б, в). a', б', в', г', d', е' – совмещение изображения результата иммуномечения и ядер клеток, окрашенных Hoechst 33342.

клеток Ито (рисунок 10 а). Это согласуется с данными других авторов о присутствии рилина в клетках Ито зародышевой печени крысы *in vivo* [Samama, Boehm, 2005]. Однако в первичной культуре печени плодов этого срока развития, а также 14- и 16-суточных зародышей, он отсутствовал, в том числе в клетках с морфологией миофибробластов (рисунок 10 б). Таким образом, присутствующие в печени клетки Ито, несмотря на их способность к выживанию в стандартных условиях *in vitro*, отмечаемую рядом авторов [Knittel et al., 1999; Nitou et al., 2000; Kobold et al., 2002; Dudas et al., 2007; Kubota et al., 2007], в наших культурах обнаружены не были. В то же время **СD90** в культурах печени 14- и 16-суточных зародышей выявлялся не только в типичных фибробластах, но и в клетках с характерной морфологией миофибробластов (рисунок 10 в). Изредка его экспрессия клетками данного типа отмечалась не только в первичных, но и в пассируемых культурах (рисунок 10 г).

Таким образом, результаты иммуноцитохимического исследования свидетельствуют о принадлежности миофибробластоподобных клеток в культуре зародышевой печени к

популяции портальных миофибробластов, а не клеток Ито. Согласно литературным данным, эти клетки способны к пролиферации *in vitro* в течение по крайней мере нескольких пассажей [Knittel et al., 1999; Ramadori, Saile, 2002]. Возможно, расположение миофибробластов кластерами, иногда наблюдаемое в первичной культуре, было результатом пролиферации, однако, судя по отсутствию крупных колоний, а также по редкой встречаемости подобных клеток в пассируемых культурах, их рост *in vitro* не был активным.



Рисунок 10. Иммунофенотип миофибробластоподобных клеток зародышевой печени: а – клетки, экспрессирующие рилин, на срезе печени 20-суточного зародыша; б – отсутствие рилина в первичной культуре печени 16-суточных зародышей; в – CD90 на миофибробластах в первичной культуре печени 14-суточных зародышей; г – CD90 на миофибробластах из печени 16-суточных зародышей у г – CD90 на миофибробластах из печени 16-суточных зародышей; г – CD90 на миофибробластах из печени с применением флуорохрома Alexa 488. a', б', в', г' – совмещение изображения результата иммуномечения и ядер клеток, окрашенных Hoechst 33342.

2.2. Колонии черепицеобразных клеток

2.2.1. Численность и морфология колоний, содержащих черепицеобразные клетки

Колонии черепицеобразных клеток с невысокой частотой встречались в первичных культурах печени 14- и 16-суточных зародышей, практически отсутствовали в культуре печени 20-суточных плодов (таблица 3) и никогда не выявлялись в культуре костного мозга. Обычно они состояли из 50-200 округлых, овальных или полигональных клеток без отростков, иногда двуядерных; некоторые клетки находились в митозе (рисунок 11 а-в). Большинство подобных колоний имели четкие границы и высокую плотность упаковки клеток; в пределах колонии клетки были достаточно однородны по величине и морфологии. Однако некоторые колонии

содержали также и фибробласты различной степени распластанности, расположенные по периферии или между группами черепицеобразных клеток (рисунок 11 г).

Несмотря на очевидную способность черепицеобразных клеток к пролиферации *in vitro*, на что указывали наблюдаемые митотические фигуры и сам факт образования колоний, в пассируемых культурах мелкие группы подобных клеток выявлялись только на 1-м пассаже,



субкультивировании. Попытки пересева индивидуальных черепицеобразных колоний с помощью клонирующих дисков не имели успеха, тогда как пересев тем же методом колоний фибробластов,

исчезая при дальнейшем

образованных КОЕ-Ф печени 16-суточных

Рисунок 11. Колонии, содержащие черепицеобразные клетки, в первичной культуре печени зародышей крысы 14 (а, б) и 16 (в, г) суток развития: общий вид колонии а черепицеобразных клеток; б, фрагменты колонии в митозы); (стрелками показаны г _ смешанная колония черепицеобразных u фибробластоподобных клеток. Окрашивание азур-эозином (а-в) или гематоксилином (г). Увел.: об. x4, ок. x10 (a, г); об. x 20, ок. x10 (б, в).

зародышей или зрелого костного мозга, в большинстве случаев приводил к образованию монослоя. Мы полагаем, что успешное размножение черепицеобразных клеток в

требует разработки соответствующих протоколов их снятия и пересева.

	TT			~				U
аблина К	Чиспо	гопоции	иепепинел	naguliv	V TATAV D	WURLTUNGY	пририи	29NOTLIHEW
 аолица э.	Inchio	NUJIUIIIII	пореницео	Upasiidia	MICION D	• КУЛЬІ У РАА	IIC ICHM	зародышси
,			1	1		J J J		1 1

Срок разрития зарон шой	Число черепицеобразных колоний	Доля в общем числе		
Срок развития зародышей	на 1 млн посаженных клеток	колоний		
	0,84±0,10	12,43±1,32%		
14 суток	0,31±0,13	4,31±1,25%		
	$0,98 \pm 0,32$	$3,89 \pm 1,15\%$		
	0,35±0,11	3,74±0,54%		
16 суток	$0,77\pm0,25$	4,72±1,69%		
	$0,38{\pm}0,07$	3,88±0,82%		
	0,03±0,02	1,00±0,89%		
20 суток	$0,00{\pm}12,37$	0,00±12,37%		
	$0,00{\pm}12,37$	0,00±12,37%		

2.2.2. Экспрессия маркеров эпителиальных и эндотелиальных клеток

Морфология клеток, образующих черепицеобразные колонии, позволяла предположить их эпителиальную или эндотелиальную природу. В печени зародышей мыши описаны родоначальные клетки эндотелия, формирующие *in vitro* клональные колонии, морфологически сходные с обнаруженными в нашей работе [Cherqui et al., 2006]. Однако проведенное нами иммуноцитохимическое окрашивание первичных культур печени 14-, 16- и 17-суточных зародышей на эндотелиальный маркер CD144 (VE-кадгерин) не выявило его в колониях черепицеобразных клеток (рисунок 12 а), хотя вне их отмечались немногочисленные полигональные клетки с положительной реакцией, расположенные поодиночке или мелкими плотными группами. При этом колонии черепицеобразных клеток полностью окрашивались на панцитокератин (рисунок 12 б), что может говорить об их эпителиальном происхождении. типов Иммуноцитохимическое выявление конкретных цитокератинов, свойственных различным популяциям эпителиальных клеток печени, показало, что черепицеобразные клетки большинства колоний содержат цитокератин-19 – маркер холангиоцитов (рисунок 12 в). Гепатоцитарный маркер цитокератин-18 присутствовал лишь в немногочисленных округлых или полигональных клетках и их небольших группах, но не в типичных колониях черепицеобразных клеток (рисунок 12 г). При этом мы не обнаружили коэкспрессии цитокератина-18 и цитокератина-19, характерной для стволовых клеток печеночного эпителия [Schmelzer et al., 2007] и их потомков - бипотентных гепатобластов [Terrace et al., 2007].



Рисунок 12. Выявление маркеров эндотелия и эпителия в колониях черепицеобразных клеток в первичной культуре печени зародышей: а - CD144; б – панцитокератин; в – цитокератин-19; г – цитокератин-18. а, в, г – 16 суток эмбриогенеза; б – 14 суток эмбриогенеза. Непрямое иммунофлуоресцентное мечение с применением флуорохрома Alexa 568 (а, г) или Alexa 488 (б, в). а', б', в', г' – совмещение изображения результата иммуномечения и ядер клеток, окрашенных Hoechst 33342.

Таким образом, наблюдаемые нами колонии черепицеобразных клеток, по-видимому, не идентичны кластерам гепатобластов, которые, по некоторым данным, могут присутствовать в первичной культуре печени зародышей крысы [Mansuroglu et al., 2009]. Впрочем, для окончательных выводов о природе эпителиальных клеток, образующих эти колонии, требуются дополнительные исследования с применением более широкого спектра антигенных маркеров.

смешанных Следует отметить, что В колониях, содержащих наряду с черепицеобразными и фибробластоподобные клетки, панцитокератин и цитокератин-19 выявлялись в клетках обоих типов (рисунок А.З а). Более того, на них полностью или частично колонии, состоящие исключительно окрашивались некоторые ИЗ фибробластов, И немногочисленные миофибробластоподобные клетки (рисунок А.З б, в). Встречались и единичные клетки с морфологией фибробластов или миофибробластов, содержащие цитокератин-18, иногда одновременно с десмином (рисунок А.3 г). Возможно, эти наблюдения отражают явление эпителио-мезенхимного перехода, характерного для клеток печени в пренатальном онтогенезе. Сочетание фенотипических признаков эпителия и мезенхимы описано в клетках кроветворной стромы печени [Chagraoui et al., 2003], печеночных стволовых клетках [Deng et al., 2011], MCK [Wenceslau et al., 2011] и клетках Ито [Lim et al., 2002]. Предполагается возможное происхождение подобных клеток как из мезенхимного, так и из энтодермального компонента печени [Valdés et al., 2002; Chagraoui et al., 2003; Li et al., 2011].

В первичной культуре зрелого костного мозга нами также были отмечены отдельные фибробластоподобные клетки, содержащие цитокератин-19 (но не цитокератин-18) (рисунок А.З д). Наши наблюдения согласуются с данными литературы об экспрессии этого маркера минорной субпопуляцией МСК костного мозга мыши *in vitro* [Okumura et al., 2009].

В пассируемых культурах печени 16-суточных зародышей цитокератин-18 отсутствовал. Цитокератин-19 выявлялся лишь на 1-м пассаже в мелких группах черепицеобразных клеток и в единичных фибробластах (рисунок А.З е); в культурах 2-го пассажа его экспрессии не отмечено.

Таким образом, наблюдаемые нами в первичной культуре зародышевой печени черепицеобразные клетки, имеющие, скорее всего, эпителиальную природу, в ходе пассирования постепенно исчезают, о чем сообщают и другие авторы [Deurholt et al., 2006; Mansuroglu et al., 2009]. По-видимому, при стандартных условиях культивирования они либо не выдерживают конкуренции с более активно пролиферирующими фибробластами, либо теряют исходные фенотипические характеристики в результате эпителио-мезенхимного перехода.

121

2.3. Скелетно-мышечные элементы



2.3.1. Морфология и фенотип спонтанно образующихся миотуб

Рисунок 13. Миосимпласты в первичной культуре клеток зародышей крысы: а – печень, 15 суток эмбриогенеза; б – печень, 16 суток эмбриогенеза; в, г – печень, 17 суток эмбриогенеза; д – печень, 20 суток эмбриогенеза; е – мышцы задних конечностей, 17 суток эмбриогенеза. Прижизненная съемка, фазовый контраст (а, д), окрашивание азур-эозином (б, в, е), цитохимическая реакция на щелочную фосфатазу, докрашивание гематоксилином (г). Увел.: об. х 10, ок. х10 (а, б, г, д); об. х4, ок. х10 (в, е).

Симпласты с морфологией скелетно-мышечных миотуб встречались в первичных культурах зародышей печени крысы 15, 16, 17 и 20, не 14 суток но развития Паюшина и др., 2009; Шевелева и др., 2011]. Наиболее многочисленны они были в культурах от 16-17-суточных И зародышей. Первые небольшие симпласты появлялись в этих культурах через 7-8 суток после посева, в дальнейшем их число И размеры увеличивались, и на 10-12-e сутки культивирования

наблюдались рыхлые скопления из десятков подобных структур (рисунок 13 б-г). Часто они располагались

поверх колоний фибробластов, вероятно, используя их как фидерный слой. В состав скоплений входили структуры различной зрелости – веретеновидные клетки, подобные миобластам; двуядерные вытянутые клетки; узкие миотубы с 4-5 ядрами, расположенными цепочкой;

разветвленные симпласты с 10 и более ядрами. Наблюдаемые структуры демонстрировали интенсивную базофилию цитоплазмы, указывающую на активный синтез белков, и активность ЩФ, которая считается характерной для скелетных мышц [Safadi et al., 1997] (рисунок 13 г). После 13-14 суток культивирования они проявляли признаки деградации – неравномерно утолщались, фрагментировались и откреплялись от субстрата. Морфология и динамика формирования симпластов в культуре печени 17-суточных зародышей были сходны с таковыми в первичной культуре клеток из мышц задних конечностей тех же зародышей (рисунок 13 е), с тем различием, что в культуре из мышц миотубы появлялись уже через 5 суток (возможно, изза большего содержания миогенных клеток в тканях конечностей). Ту же морфологию имели и симпласты в культурах клеток из печени 15- и 20-суточных зародышей (рисунок 13 а, д), но они формировались реже и в меньшем количестве, чем в культурах от 16- и 17-суточных зародышей.

Иммуноцитохимический анализ на фенотипические маркеры миогенеза подтвердил скелетно-мышечную природу симпластов. Специфический для скелетного миогенеза фактор транскрипции МуоD, появляющийся в миобластах на ранних стадиях дифференцировки и запускающий экспрессию структурных мышечных генов [Olson, 1990; Bryson-Richardson, Currie, 2008], выявлялся в ядрах некоторых клеток уже после 3 суток культивирования. В дальнейшем он сохранялся в формирующихся многоядерных структурах (рисунок 14 а). Фактор транскрипции **Myf5**, также начинающий экспрессироваться на ранних стадиях скелетного миогенеза и играющий важную роль в детерминации мышечных предшественников [Bryson-Richardson, Currie, 2008], обнаруживался в отдельных клетках и симпластах – как молодых, так и зрелых (рисунок 14 б). Мембранный белок **м-кадгерин**, участвующий в слиянии миобластов [Rose et al., 1994], присутствовал как в одно-двуядерных клетках начиная с 5 суток культивирования, так и в образующихся позднее симпластах (рисунок 14 в). Десмин, который, по данным литературы, впервые появляется в миобластах и сохраняется на всем протяжении их дифференцировки [Kaufman, Foster, 1988; Li, Capetanaki, 1993], был обнаружен в вытянутых одноядерных клетках и симпластах различной величины (рисунок 14 г). В некоторых одноядерных клетках, расположенных в скоплениях симпластов, он колокализовался с антигеном Ki-67 – маркером активных фаз клеточного цикла (G1, S, M и G2) [Scholzen, Gerdes, 2000], что говорит о пролиферации миогенных клеток в очагах дифференцировки (рисунок 15). Тяжелые цепи миозина 2-го типа, характерные для быстрых мышечных волокон, после 10-12 суток культивирования обнаруживались в многоядерных структурах с морфологией зрелых миотуб (рисунок 14 д).

В связи с обнаружением в первичной культуре зародышевой печени миогенных клеток встает вопрос об их происхождении. Коммитированные к скелетному миогенезу клетки, спонтанно сливающиеся в миотубы *in vitro*, были найдены различными авторами во многих

немышечных органах – в частности, в поджелудочной железе половозрелой мыши [Di Rocco et al., 2008], в печени, костном мозге и тимусе плода человека [Gornostaeva et al., 2006], в ряде органов зародыша цыпленка, включая печень [Gerhart et al., 2001]. Проведенный нами иммуногистохимический анализ срезов печени зародышей крысы на МуоD выявил его в некоторых ядрах, что подтверждает изначальное присутствие в нативном органе клеток, коммитированных к миогенезу (рисунок A.4). Однако микроокружение печени, видимо, препятствует реализации миогенных потенций этих клеток *in situ*, тогда как при выделении в культуру создаются условия, способствующие их дифференцировке [Шевелева и др., 2011].

При этом в подавляющем большинстве случаев спонтанный миогенез был отмечен лишь в первичных культурах. При их пассировании единичные миотубы крайне редко наблюдались на 1-м пассаже и только в исключительных случаях – на следующих [Паюшина и др., 2009], а при попытках пересева очагов миогенеза с помощью клонирующих дисков в культуре росли только фибробласты. Результат иммуноцитохимического выявления МуоD в культурах клеток из печени 17-суточных зародышей на 1-м и 2-м пассажах был, как правило, отрицателен (рисунок А.5).

Скопления миотуб, морфологически подобных образуемым клетками из печени и мышц, иногда формировались и в первичной культуре селезенки 17-суточных зародышей. Иммуноцитохимическое выявление МуоD, десмина и миозина 2 типа подтвердило их принадлежность к скелетно-мышечной ткани (рисунок А.6). Таким образом, печень – не единственный немышечный орган зародыша крысы, содержащий миогенные клетки. Данные литературы [Gerhart et al., 2001; Gornostaeva et al., 2006] указывают на их широкое распространение в организме, по крайней мере, в пренатальном развитии, хотя уточнение этого вопроса требует дополнительных исследований.

В культурах зрелого костного мозга морфологические признаки миогенеза отсутствовали, а МуоD и десмин иммуноцитохимически не обнаруживались.

2.3.2. Функциональные характеристики миотуб

В ходе прижизненного наблюдения за культурами клеток из печени 17-суточных зародышей с очагами миогенеза в некоторых случаях были отмечены спонтанные сокращения миотуб. Они происходили на 10-12-е сутки культивирования в среде DMEM, отличающейся от применяемой нами в большинстве экспериментов αМЕМ повышенным содержанием Ca²⁺, и были характерны для крупных миотуб вытянутой или разветвленной формы. Для оценки функциональной полноценности исследуемых миотуб мы проанализировали их способность связывать α-бунгаротоксин – агонист никотиновых холинорецепторов, применяемый для изучения



Рисунок 14. Иммунофенотип миосимпластов в первичной культуре клеток печени 16-суточных (б, г) и 17-суточных (а, в, д) зародышей крысы: а - МуоD, 10 суток культивирования; б – Муf-5, 8 суток культивирования; в – м-кадгерин, 10 суток культивирования; г – десмин, 8 суток культивирования; д – тяжелые цепи миозина 2-го типа, 10 суток культивирования. Непрямое иммунофлуоресцентное мечение с применением флуорохрома Alexa 568 (а-в, д) или Alexa 488 (г). а', б', в', г', д' – совмещение изображения результата иммуномечения и ядер клеток, окрашенных Hoechst 33342.



Рисунок 15. Двойное иммуноцитохимическое окрашивание первичной культуры печени 15-суточных зародышей (9 суток культивирования) на десмин и Ki-67: а – десмин, непрямое иммунофлуоресцентное мечение с применением флуорохрома Alexa 568; б - Ki-67, прямое иммунофлуоресцентное окрашивание антителами, меченными ФИТЦ; в – совмещение изображения результатов иммуномечения и ядер клеток, окрашенных Hoechst 33342. Стрелками показаны клетки, коэкспрессирующие десмин и Ki-67. физиологических свойств скелетных мышц [Axelrod et al., 1976; Yee et al., 1978]. Инкубация культур печени и селезенки 17-суточных зародышей с меченым α-бунгаротоксином позволила выявить локальные участки его связывания на некоторых крупных неразветвленных миотубах. Подобные участки присутствовали и на миотубах, формирующихся в первичных культурах зародышевых мышц (рисунок А.7). Полученные результаты, свидетельствующие о присутствии кластеров никотиновых холинорецепторов на поверхности миотуб, согласуются с имеющимися в литературе данными об экспрессии этих рецепторов скелетными мышцами в пренатальном онтогенезе [Yee et al., 1978] и подтверждают функциональную зрелость мышечных элементов, образуемых *in vitro* клетками из печени и селезенки зародышей.

2.3.3. Адгезивные свойства предшественников миотуб

2.3.3.1. Адгезия миогенных предшественников к белкам внеклеточного матрикса

В ходе экспериментов с первичными культурами клеток из печени зародышей мы обнаружили, что на фибронектине миотубы образуются чаще, чем на пластике. Известно, что на скелетных миобластах и миотубах присутствует специфически связывающийся с фибронектином интегрин α5β1 [Enomoto et al., 1993]. В опытах на линии миобластов мыши C2 была показана



Рисунок 16. Число миотуб в первичной культуре клеток из печени 17-суточных зародышей на пластике (пл), фибронектине (фн), коллагене I типа (кол) и ламинине (лам). Достоверность различий с пластиком: * - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001.

ламинине. Полученные результаты (рисунок 16)

необходимость взаимодействий с фибронектином для терминальной мышечной дифференцировки [MacCalman et al., 1992]. Есть данные, что в миогенезе играют роль и другие белки внеклеточного матрикса – в частности, коллаген и ламинин [Kühl et al., 1986; von der Mark, Ocalan, 1989; Burkin, Kaufman, 1999].

Для оценки влияния матриксных белков на адгезию и дифференцировку миогенных клеток из зародышевой печени мы сравнили число миотуб, образующихся в культуре печени 17суточных зародышей на пластике, фибронектине, коллагене I типа и подтвердили наши предварительные наблюдения об усиленном миогенезе на фибронектине. Можно предположить, что эффект данного белка обусловлен прикреплением к нему большего, чем к пластику, числа миогенных клеток; кроме того, обеспечивая прочную адгезию этих клеток или зрелых миотуб, он может препятствовать их откреплению. Не исключено и влияние фибронектина на процесс слияния миобластов, что подтверждается данными литературы [MacCalman et al., 1992]. Аналогичный эффект, хотя и менее выраженный по сравнению с фибронектином, оказывал и коллаген I типа, что согласуется с данными других авторов, полученными на клетках из мышц [Eberli et al., 2009]. Ламинин, несмотря на сообщения о стимуляции им миогенеза *in vitro* [von der Mark, Ocalan, 1989], на число миотуб не влиял.

2.3.3.2. Содержание миогенных предшественников в субпопуляциях клеток, различающихся по срокам прикрепления к пластику

Как известно, популяции миогенных предшественников различной зрелости неодинаковы по адгезивным свойствам: клетки, более продвинутые по пути дифференцировки, прикрепляются к субстрату быстрее менее коммитированных [Qu-Petersen et al., 2002]. Таким образом, по сроку адгезии можно судить о положении клеточной популяции в диффероне скелетных мышц. Для оценки степени зрелости клеток зародышевой печени, ответственных за спонтанный миогенез *in vitro*, мы сравнили число миотуб, образуемых популяциями клеток, прикрепляющихся и не прикрепляющихся к пластику за различные сроки инкубации. Свежевыделенные клетки из печени 17-суточных зародышей инкубировали на пластике 1, 5 или 24 ч, после чего переносили на фибронектиновое покрытие и продолжали культивировать до образования миотуб, как и исходные культуры на пластике.

	Таблица	4.	Число	миотуб,	образуемых	клетками	ИЗ	зародышевой	печени
прикр	епляющих	хся і	к субстр	ату в разн	ње сроки				

Вариант	Срок адгезии					
	1ч	5ч	1 сутки			
Адгезия к пластику	$1,91{\pm}1,18$	4,21±2,00	2,50±1,26			
Перенос на фибронектин	$2,30\pm1,55$	$1,45\pm1,03$	$0,00{\pm}14,09$			

Примечание. Приведено число миотуб в пересчете на 1 см² площади поверхности

Как видно из таблицы 4, миогенные предшественники присутствовали во всех изучаемых популяциях, кроме клеток, не прикрепивщихся за 24 ч. По литературным данным [Qu-Petersen et al., 2002], быстрая адгезия к субстрату свойственна миобластам, тогда как миосателлиты могут оставаться во взвеси около 24 ч, а еще более ранняя популяция мышечных стволовых клеток - до двух недель. Следовательно, адгезия всех миогенных клеток из печени

зародышей в первые 24 ч может свидетельствовать об отсутствии среди них наиболее ранних предшественников.

Таким образом, совокупность данных иммуноцитохимического анализа и изучения адгезивных свойств миогенных клеток зародышевой печени указывает на их принадлежность к миобластам. Можно предположить, что, мигрируя из сомитов в область формирования скелетных мышц, миогенные предшественники заселяют печень, селезенку и, возможно, другие органы зародыша. При этом микроокружение, создаваемое стромой этих органов в период активного кроветворения, может благоприятствовать выживанию не только кроветворных, но и миобластами многих регуляторных молекул, включая кроветворные цитокины [Henningsen et al., 2010], нельзя полностью исключить возможность участия эктопических миогенных клеток в поддержании гемопоэза.

В целом результаты анализа клеточного состава первичной культуры зародышевой печени позволяют охарактеризовать ее как высокогетерогенную популяцию, содержащую множество типов клеток, не являющихся МСК. Очевидно, эти клетки уступают МСК по пролиферативной активности и постепенно исчезают в ходе пассирования, вследствие чего популяция становится более гомогенной. В связи с этим дальнейшие эксперименты по сравнительной характеристике МСК из разных органов были выполнены на пассируемых культурах, не содержащих значительной примеси посторонних клеток.

3. Характеристика МСК в монослое при последовательном пассировании (субкультивировании)

Последовательный пересев культуры МСК позволяет не только сделать популяцию более чистой, но и нарастить клетки в количестве, необходимом для экспериментальных или клинических целей. По данным многих авторов, при длительном пассировании МСК теряют первоначальные свойства, том числе способность к росту и дифференцировке [DiGirolamo et al., 1999; Banfi et al., 2000; Kang et al., 2004; Chen et al., 2005; Bonab et al., 2006; Neuhuber et al., 2008], но на первых нескольких пассажах их пролиферативная активность и потенции еще сохраняются [Bonab et al., 2006; Aнохина, Буравкова, 2007; Neuhuber et al., 2008]. В этой связи при сравнительном исследовании МСК из различных органов мы избегали многократного пассирования, анализируя клетки после 1 – 4 пассажей. Прежде чем изучать потенции МСК различной локализации к дифференцировке под влиянием индукторов, мы охарактеризовали их рост в стандартной среде. При этом представляло интерес не только сравнить пролиферативную активность, морфологию и фенотип МСК из разных источников в отсутствие

примеси посторонних клеток, могущей затруднять интерпретацию получаемых данных, но и выяснить, как эти свойства МСК изменяются в ходе первых нескольких пассажей и зависит ли длительность их сохранения от органной принадлежности клеток или стадии онтогенеза.

3.1. Оценка пролиферативной активности пассируемых клеток стромы кроветворных органов на основании экспрессии антигена Ki-67

Для оценки относительного содержания пролиферирующих клеток культуры МСК из костного мозга, печени и селезенки на стадии субконфлюэнтного монслоя подвергали иммуноцитохимическому окрашиванию на маркер пролиферативной активности Ki-67 [Scholzen, Gerdes, 2000] и определяли долю ядер с положительной реакцией (таблица 5).

Сравнение результатов анализа культур на 1-м пассаже показывает, что наименьшей пролиферативной активностью обладают клетки от половозрелых животных. Так, в культуре их селезенки доля клеток, содержащих Ki-67, была достоверно (p<0,05) ниже по сравнению со всеми изученными пренатальными источниками, а в культуре костного мозга – по сравнению с культурами печени 16-суточных и селезенки 20-суточных зародышей (тенденция к ее снижению по сравнению с остальными пренатальными органами была статистически недостоверной). В культурах печени и селезенки максимальная доля пролиферативная активность клеток из печени 16-суточных зародышей была достоверной). В культурах печени и селезенки максимальная доля пролиферативная активность клеток из печени 16-суточных зародышей была достоверно выше, чем у 20-суточных (p<0,05), а для клеток из селезенки в период активного миелопоэза (20 суток пренатального развития) этот показатель превышал таковой для селезенки половозрелых крыс, где происходит в основном лимфопоэз (p<0,001). Однако в культуре из бедренной кости 20-суточных плодов с зачатком костного мозга половозрелых крыс. Вероятно, это можно объяснить вкладом клеток из других тканей, составляющих кость зародыша (надкостницы, костной и хрящевой тканей).

Таким образом, с одной стороны, доля пролиферирующих стромальных клеток зависела от активности гемопоэза в органе, что ранее было показано для КОЕ-Ф [Versele et al., 1987] и, видимо, указывает на участие МСК в построении кроветворного микрооокружения. С другой стороны, этот показатель выказывал зависимость от стадии развития: МСК из зрелых тканей, как правило, пролиферировали менее активно по сравнению с зародышевыми, что также подтверждается данными литературы [Guillot et al., 2007; Zhang et al., 2009; Moreno et al., 2010].

В ходе пассирования культур как из эмбриональных, так и из постнатальных источников доля пролиферирующих клеток снижалась. В культурах зрелого костного мозга и печени 16суточных зародышей это происходило на 3-м пассаже, в культурах селезенки – на 2-м. Очевидно, наблюдаемое снижение пролиферативной активности отражает репликативное старение МСК в связи с ограниченностью их пролиферативного потенциала.

Источник клеток	Пассаж	Длительность культивирования, сутки	Доля Ki-67+ клеток
	1	2	70,30±4,28%
	2	1	71,61±3,19%
зрелыи костныи мозг	3	1	53,27±5,70%
	4	1	48,70±4,89%
Печень 14-суточных зародышей	1	1	75,40±4,28%
	1	2	82,23±3,16%
Печень 16-суточных зародышей	2	1	90,24±1,46%
	3	1	61,96±3,51%
Печень 20-суточных зародышей	1	4	72,86±2,60%
Кость 20-суточных зародышей	1	1	76,71±5,43%
Селезенка 20-суточных зарольшей	1	2	87,11±2,18%
Селезенка 20-суточных зародышей	2	1	52,67±3,87%
Зпелая селезенка	1	1	59,62±4,75%
эрелая селезенка	2	1	16,81±2,57%

Таблица 5. Иммуноцитохимический анализ присутствия Кі-67 в культурах МСК из кроветворных органов крысы

Примечание. Долю Ki-67⁺ клеток подсчитывали под микроскопом (увел.: об. x20, ок. x10) в 20-27 полях зрения.

3.2. Морфология и фенотип пассируемых стромальных клеток

3.2.1. Морфологические изменения клеток в ходе пассирования

Спустя 1 – 2 суток после пересева на 1-й пассаж культуры клеток из всех изученных источников – зрелого костного мозга, бедренной кости 20-суточных плодов, печени 14-, 16- и 20-суточных зародышей, зародышевой и зрелой селезенки – имели вид монослоя, состоящего почти исключительно из фибробластоподобных клеток. Среди них имелись как небольшие узкие клетки веретеновидной, треугольной или отростчатой формы, так и крупные, сильно распластанные. имеюшие полигональную или неправильную Подобная форму. морфологическая гетерогенность культур МСК отмечалась многими авторами и, по данным большинства из них, отражает различную зрелость клеток: малый размер и узкая форма присущи молодым, быстро делящимся и наиболее потентным клеткам, а крупные плоские клетки являются более зрелыми, с ограниченной способностью к росту и дифференцировке [Mets et al., 1981; Colter et al., 2001; Prockop et al., 2001; Анохина, Буравкова, 2007; Neuhuber et al., 2008]. На 1-м пассаже во всех изученных нами культурах преобладали узкие клетки. В ходе пассирования культур зрелого костного мозга (рисунок 17 а-г) соотношение типов клеток менялось в пользу распластанных, и на 3-4-м пассаже они становились преобладающими, что сопровождалось существенным замедлением роста культуры. Известно, что накопление плоских клеток и снижение скорости роста являются признаками старения культуры МСК, коррелирующими с потерей потенций [Bonab et al., 2006; Neuhuber et al., 2008]. В культурах печени 16-суточных зародышей (рисунок 17 д-з) доля плоских клеток к 3-му или 4-му пассажу возрастала не столь сильно, а замедление роста было менее выраженным. Наши наблюдения могут говорить о высоком пролиферативном потенциале МСК из печени зародышей и их меньшей по сравнению с клетками зрелого костного мозга подверженности старению, что отмечают и другие авторы [Guillot et al., 2007].

Различия в темпах изменения морфологии клеток от зародыша и взрослого организма наиболее наглядно проявлялись в случае селезенки (рисунок 18): уже на 2-м пассаже в культуре зрелого органа узкие клетки почти полностью сменялись плоскими, тогда как большинство клеток от зародышей сохраняли вытянутую или отростчатую форму. Это еще раз подтверждает зависимость скорости старения клеток от стадии онтогенеза, неоднократно показанную для МСК различной локализации [Stenderup et al., 2003; Guillot et al., 2007; Asumda, Chase, 2011; Zhang et al., 2012 a].



Рисунок 17. Пассируемые культуры стромальных клеток зрелого костного мозга (a – г) и печени 16-суточных зародышей (e- з) крысы: a, д – 1-й пассаж; б, е – 2-й пассаж; в, ж – 3-й пассаж; г, з – 4-й пассаж. Цитохимическая реакция на ЩФ (показана стрелками), докрашивание гематоксилином. Увел.: об. x10, ок. x10.



Рисунок 18. Пассируемые культуры стромальных клеток селезенки 20-суточных зародышей (а, б) и половозрелых крыс (в, г): а, в – 1-й пассаж; б, г – 2-й пассаж. Окрашивание азур-эозином. Увел.: об. x10, ок. x10.

3.2.2. Оценка содержания остеогенных клеток в пассируемых культурах на основании активности щелочной фосфатазы

Данные литературы об изменении потенций МСК (в частности, остеогенных) в ходе пассирования противоречивы [DiGirolamo et al., 1999; Banfi et al., 2000; De Bari et al., 2001; Kang et al., 2004; Seruya et al., 2004; Chen et al., 2005; Bonab et al., 2006; Анохина, Буравкова, 2007; Neuhuber et al., 2008]. По-видимому, степень сохранения этих потенций в значительной мере зависит от источника клеток и условий культивирования.

Для того чтобы в первом приближении оценить остеогенные потенции пассируемых клеток из костного мозга половозрелых крыс и печени 16-суточных зародышей, мы подсчитали долю клеток с реакцией на ЩФ (таблица 6). В культуре костного мозга клетки, содержащие этот фермент, присутствовали на всех изученных пассажах (см. рисунок 17 а–г). Они располагались равномерно, не образуя крупных скоплений, и могли быть как узкими, так и распластанными. К 4-му пассажу их доля снижалась, а реакция обычно ослабевала, хотя в некоторых клетках была не менее интенсивна, чем на предыдущих пассажах. Полученные

Источник клеток	Опыт	Пассаж	Доля ЩФ+ клеток
		1	17,26±2,82%
Spoult i roomuli voor	1	2	27,63±1,95%
эрелый костный мозг		3	22,31±1,96%
		4	12,30±2,07%
		1	$0,21\pm0,15\%$
	1	2	$0,00\pm 5,55\%$
		3	9,64±2,41%
печень то-суточных	2	1	0,53±0,29%
зародышей		2	0,00±4,34%
		3	0,75±0,43%
		4	1,15±0,65%

Таблица 6. Доля ЩФ+ клеток в пассируемых культурах МСК крысы

Примечание. Щ Φ^+ клетки подсчитывали под микроскопом (увел.: об. x10, ок. x10) в 20-

25 полях зрения.

данные могут указывать на умеренное снижение остеогенных потенций МСК в ходе пассирования, хотя такой вывод требует подтверждения в экспериментах по индукции их терминальной дифференцировки.

В культуре печени зародышей (см. рисунок 17 д-з) на первых двух пассажах реакция на ЩФ отсутствовала либо выявлялась лишь в единичных клетках и была крайне слабой. В ходе дальнейшего пассирования в одном из двух проведенных экспериментов содержание Щ Φ^+ клеток существенно возрастало, в другом отмечалась статистически недостоверная тенденция к его увеличению. Можно предположить, что исходно низкие остеогенные потенции МСК из зародышевой печени объясняются меньшей онтогенетической зрелостью этих клеток по сравнению с происходящими из костного мозга. Не исключено, что при длительном культивировании в стандартной среде могло происходить их созревание, сопровождающееся коммитированием к остеогенезу, что выражалось в появлении активности Щ Φ .

3.2.3. Антигенный фенотип пассируемых клеток: экспрессия маркеров МСК

Как известно, профиль экспрессии поверхностных маркеров МСК изменяется в ходе их культивирования *in vitro*. Так, на стромальных клетках из костного мозга человека одни маркеры (CD105, CD90, CD73) стабильно экспрессируются в течение многих пассажей, тогда как другие, присутствующие на свежевыделенных МСК (CD106, CD271, Stro-1), быстро исчезают с поверхности культивируемых клеток [Boxall, Jones, 2012]. Для выяснения вопроса, сохраняются ли при субкультивировании клеток изучаемых нами органов антигены CD73, CD90 и CD106, выявленные в первичных культурах, мы провели иммуноцитохимический анализ присутствия этих маркеров в пассируемых культурах из тех же источников (таблица 7).

Фенотип пассируемых клеток имел те же межорганные различия, которые наблюдались в первичных культурах. Так, **CD90** (рисунок 19) имелся на большинстве (75-98%) клеток зрелого костного мозга, печени на всех изученных сроках эмбриогенеза и зародышевой селезенки; в культурах кости 20-суточных плодов доля несущих его клеток была несколько меньшей (50-60%). В то же время на клетках зрелой зрелой селезенки этот антиген выявлен не был. **CD73** (рисунок 20) обнаруживался на 60-90% клеток зрелого костного мозга и 50-70% клеток из печени зародышей (кроме 14-суточных, в культуре от которых его содержали лишь 15-30% клеток). Однако в культуре кости 20-суточных плодов этот антиген либо полностью отсутствовал, либо имелся на меньшинстве клеток (не более 25% от общего числа). В культурах зародышевой и зрелой селезенки его также содержали только немногие клетки, доля которых не превышала 20%. Клетки, несущие **CD106** (рисунок 21), во всех культурах были, как правило, малочисленны. Для зрелого костного мозга и печени 16-суточных зародышей отмечалась

133

тенденция к повышению их содержания в ходе пассирования, в противоположность данным других авторов, сообщавших о снижении экспрессии этого антигена в пассируемой культуре MCK из костного мозга человека [Halfon et al., 2011]. Так, в культуре костного мозга на 2-м - 4-м пассажах доля CD106⁺ клеток приближалась к 25-30%, а в культуре печени на 3-м пассаже иногда превышала 50%. В остальных случаях сравнение результатов анализа одной и той же культуры на нескольких последовательных пассажах не выявило существенных различий в экспрессии изучаемых маркеров, то есть, по крайней мере, на протяжении используемых нами сроков культивирования клетки каждого органа сохраняли стабильный фенотип.

	Таблица 7. Иммунофенотип	стромальных	клеток	кроветворных	органов	крысы	В
пассир	уемой культуре						

	Источник клеток	Пассаж	CD73	CD90	CD106
		1	н/а	н/а	+
Костині	Зпеший	2	н/а	н/а	+
МО2Г МО2Г	эрелый	3	+	+	н/а
MUSI		4	н/а	н/а	+
	Кость 20-суточных зародышей	1	±	+	<u>+</u>
		1	+	+	н/а
	14 суток эмбриогенеза	2	н/а	+	н/а
		3	н/а	+	н/а
		1	н/а	+	+
Печень	16 суток эмбриогенеза	2	н/а	н/а	+
		3	+	+	+
		1	+	+	н/а
	20 суток эмбриогенеза	2	н/а	+	н/а
		3	+	н/а	н/а
	20 суток эмбриогенеза	1	+	+	+
Селезенка	Зрелая	1	+	-	+
	эрелая	2	+	-	н/а

Примечание: + - в культуре присутствуют клетки с положительной реакцией на данный антиген; ± - клетки с положительной реакцией выявлены не во всех экспериментах; – экспрессия антигена не обнаружена; н/а – не анализировали.

Таким образом, несмотря на различия между пассируемыми культурами стромальных клеток из различных пре- и постнатальных источников по пролиферативной активности и оцениваемой по присутствию ЩФ способности к остеогенезу, большинство органов содержат клетки со сходным иммунофенотипом, характерным для MCK [Gronthos et al., 2003; Dominici et al., 2006]. Исключение составляют клетки зрелой селезенки, лишенные одного из основных маркеров MCK – CD90, хотя другие авторы сообщают об обнаружении в селезенке мыши [da Silva Meirelles et al., 2006] и человека [Hoogduijn et al., 2007] клеток со свойствами MCK, несущих этот антиген. Впрочем, фенотип стромальных клеток не связан однозначно с их

зрелостью и дифференцировочным потенциалом: имеются сообщения как о присутствии CD73 и CD90 на фибробластах различной тканевой локализации, не имеющих характерных для MCK потенций [Wagner et al., 2005; Halfon et al., 2011; Covas et al., 2008], так и об отсутствии CD90 на стромальных клетках костного мозга мыши с ярко выраженной способностью к остео- и адипогенезу [da Silva Meirelles et al., 2006; Hegyi et al., 2010]. Очевидно, использованный нами минимальный набор маркеров должен быть дополнен сравнительным анализом потенций к дифференцировке, чему и были посвящены наши дальнейшие исследования.



Рисунок 19. СD73 в пассируемых культурах клеток: а – зрелого костного мозга (3-й пассаж); б – печени 14-суточных зародышей (1-й пассаж); в – печени 20-суточных зародышей (3-й пассаж); г – зрелой селезенки (2-й пассаж). Непрямое иммунофлуоресцентное мечение с применением флуорохрома Alexa 488. a', б', в', г' – совмещение изображения результата иммуномечения и ядер, окрашенных DAPI (a', б', в') или Hoechst 33342 (г').



Рисунок 20. СD90 в пассируемых культурах клеток: а – бедренной кости 20-суточных зародышей (1-й пассаж); б – печени 14-суточных зародышей (3-й пассаж); в – печени 16суточных зародышей (1-й пассаж); г – селезенки 20-суточных зародышей (1-й пассаж). Непрямое иммунофлуоресцентное мечение с применением флуорохрома Alexa 488. a', б', в', г' – совмещение изображения результата иммуномечения и ядер, окрашенных Hoechst 33342).



Рисунок 21. CD106 в пассируемых культурах клеток: а – зрелого костного мозга (4-й пассаж); б – печени 16-суточных зародышей (3-й пассаж); в – селезенки 20-суточных зародышей (1-й пассаж); г – зрелой селезенки (1-й пассаж). Непрямое иммунофлуоресцентное мечение с применением флуорохрома Alexa 488. a', б', в', г' – совмещение изображения результата иммуномечения и ядер, окрашенных Hoechst 33342).

4. Дифференцировка МСК *in vitro* в индукционных средах

4.1. Остеогенез

4.1.1. Остеогенная дифференцировка в стандартной индукционной среде

4.1.1.1. Костный мозг

Как показало прижизненное наблюдение за МСК из **зрелого костного мозга**, культивируемыми на 1-м пассаже в остеогенной среде (рисунок А.8), через 4-5 суток после начала индукции среди монослоя появлялись участки плотно расположенных клеток, менее распластанных, чем окружающие фибробласты. В следующие 3-5 суток эти сгущения становились компактнее и постепенно обособлялись от остального монослоя, а форма клеток в них приближалась к кубической. В некоторых случаях уже после 10 суток индукции поверх скоплений дифференцирующихся клеток начинал откладываться минерализованный матрикс.

После 14-21 суток индукции очаги остеогенеза имели вид достаточно крупных (около 2-3 мм в диаметре) выпуклых узелков неправильной формы, часто сливающихся. Их клетки имели морфологические признаки остеобластов: кубическую или полигональную форму, крупные светлые ядра и интенсивную базофилию цитоплазмы, указывающую на активный синтез белка. Очаги остеогенеза интенсивно окрашивались на ЩФ; за их пределами слабая

136

реакция отмечалась лишь в сравнительно немногих фибробластах (рисунок 22 б). В центре костных узелков часто присутствовал волокнистый матрикс, окрашивающийся ализариновым красным S на соли Ca²⁺ (рисунок 22 в, г) [Кожевникова и др., 2008 а].

Контрольные культуры, росшие в среде без индукторов, в течение всего срока наблюдения представляли собой однородный по плотности монослой типичных фибробластов. Многие из них с той или иной яркостью окрашивались на ЩФ, однако клетки с положительной реакцией не образовывали плотных скоплений (рисунок 22 а). Соединения Ca²⁺ не выявлялись.



Рисунок 22. Остеогенная дифференцировка МСК костного мозга крысы: a - активность ЩФ после 15 суток роста в среде без индукторов; 6 - активность ЩФ после 15 суток индукции; b, c - активность щФ после 21 суток индукции; c крашивание ализариновым красным S. Ядра докрашены гематоксилином. Увел.: ob. x4, ok.x10 (a - b); ob. x20, ok. x10 (c).

В культурах МСК из **бедренной кости 20-суточных зародышей** выраженность остеогенеза в индукционной среде варьировала от опыта к опыту. Через 19 – 21 суток индукции очаги дифференцировки представляли собой мелкие плотные узелки, состоящие из базофильных кубических клеток, поверх которых иногда был различим внеклеточный матрикс. Многие, но не все эти узелки частично или полностью окрашивались на ЩФ, как правило, интенсивнее, чем фибробласты в контрольной культуре без индукторов (рисунок 23 а–в). Некоторые очаги остеогенеза были слабо минерализованы (рисунок 23 г). Остеокальцин, участвующий в минерализации костного матрикса и являющийся одним из наиболее специфичных маркеров терминально дифференцированных остеобластов [Stein, Lian, 1993,

Yamaguchi et al., 2000], выявлялся во многих узелках, но лишь в некоторых из составляющих их клеток (рисунок 23 д), тогда как для очагов остеогенной дифференцировки МСК зрелого костного мозга характерна его экспрессия большинством клеток [Кожевникова и др., 2009].

Таким образом, стромальные клетки зародышевой кости проявляли сравнительно слабые остеогенные потенции, что согласуется с вышеописанными данными о малочисленности клеток, содержащих ЩФ (т.е. остеогенных) в колониях, образуемых КОЕ-Ф из этого источника. Согласно сообщениям других авторов, МСК костного мозга плода по остеогенным потенциям



Рисунок 23. Остеогенная дифференцировка МСК из кости 20-суточных плодов крысы: а – контрольная культура, 19 суток в среде без индукторов; б - д – 19 суток индукции остеогенеза. а - в - цитохимическая реакция на ЩФ, ядра докрашены гематоксилином; г – окрашивание ализариновым красным S и гематоксилином; д - непрямое иммунофлуоресцентное окрашивание на остеокальцин с применением флуорохрома Alexa 488; д' – совмещение изображения результата иммуномечения на остеокальцин и ядер клеток, окрашенных Hoechst 33342. Увел.: об. x4, ок. x10 (a, б, г); об.x10, ок. x10 (b), об. x20, ок. x10 (d, d').

превосходят таковые, полученные из того же органа половозрелых доноров; впрочем, большинство подобных работ выполнены на клетках человека [Hu et al., 2002; Guillot et al., 2008; Zhang et al., 2009]. Помимо возможных видовых различий, несоответствия в результатах могут быть связаны и с невозможностью получения от плода крысы зачатка костного мозга без примеси окружающих тканей – кости, хряща, надкостницы и т.п. Характеристики МСК, содержащихся в этих тканях, описаны главным образом на постнатальных стадиях развития [Noth et al., 2002; Fickert et al., 2003; Nathan et al., 2003; Yoshimura et al., 2007; Boeuf, Richter, 2010; Tan et al., 2012]; их свойства (и, в частности, остеогенные потенции) в пренатальном онтогенезе остаются малоизученными. Очевидно, при интерпретации полученных нами результатов необходимо учитывать вклад клеток из этих источников.

4.1.1.2. Печень зародышей

Культивирование МСК из печени **14-суточных зародышей** крысы в остеогенной среде в течение 13-14 суток приводило к появлению компактных скоплений клеток, как правило, фибробластоподобных. Реже встречались скопления интенсивно базофильных кубических клеток, сходных по морфологии с остеобластами, но обычно расположенных менее плотно, чем в очагах дифференцировки МСК костного мозга. Многие, но не все клеточные скопления независимо от морфологии их клеток демонстрировали реакцию на ЩФ различной интенсивности (рисунок 24 б). Продление инкубации в остеогенной среде до 21 суток не приводило ни к усилению реакции на ЩФ, ни к существенным морфологическим изменениям. Очаги остеобластоподобных клеток оставались малочисленными и неминерализованными (рисунок 24 в). Следует отметить, что после 13-21 суток роста в контрольной среде без индукторов клетки также образовывали сгущения, в некоторых из которых отмечалась активность ЩФ. Однако окрашенные на этот фермент участки были, как правило, мельче и малочисленнее, чем в остеогенной среде, отличались менее четкими границами и более слабой реакцией (рисунок 24 а).

Результаты индукции остеогенеза в культуре МСК из печени **16-суточных зародышей** были с целом сходны с таковыми для клеток от 14-суточных зародышей: через 13-14 суток культивирования в присутствии индукторов формировались скопления фибробластоподобных или кубических клеток, отличающиеся от наблюдаемых в контрольных культурах более интенсивной реакцией на ЩФ (рисунок 24 г, д). После 18-21 суток индукции выраженность реакции оставалась прежней или несколько уменьшалась, но в некоторых очагах остеогенеза отмечалась слабая минерализация матрикса. Минерализованные узелки представляли собой мелкие (не более 1 мм в диаметре) выпуклые участки плотно расположенных кубических

клеток (рисунок 24 е); по сравнению с наблюдаемыми в культуре МСК костного мозга они были менее оформленными, значительно слабее окрашивались на соли Ca²⁺ и встречались крайне редко. В контрольных культурах без индукторов минерализация отсутствовала.

Морфометрический анализ площади, занятой ЩФ⁺ клетками, после двух-трехнедельного культивирования МСК от зародышей 14 и 16 суток развития в индукционной среде показал значительный разброс в величине очагов остеогенеза между различными опытами. При этом наблюдалась некоторая тенденция к увеличению площади областей с положительной реакцией в культурах МСК от 16-суточных зародышей по сравнению с 14-суточными, однако достоверных различий между этими сроками эмбриогенеза выявлено не было (таблица 8).

Таблица 8. Активность щелочной фосфатазы в культуре МСК из печени зародышей крысы при индукции остеогенной дифференцировки

Срок	Площадь ЩФ⁺ областей, % от площади лунки					
эмбриогенеза	13-14 суток индукции	18 суток индукции	21 сутки индукции			
14 суток	9,62±1,85%	не опр.	15,86±0,71%			
	32,36±2,32%	не опр.	не опр.			
	$1,45\pm0,28\%$	не опр.	не опр.			
16 суток	19,70±0,49%	не опр.	17,36±1,16%			
	33,56±0,86%	$29,72\pm2,09\%$	не опр.			
	9,26±1,01%	не опр.	не опр.			
20 суток	практически отсутствуют	не опр.	не опр.			

МСК из печени **20-суточных зародышей**, культивируемые 14 суток в остеогенной среде, отличались менее равномерным расположением клеток, чем в среде без индукторов, но клеточные скопления в этих культурах состояли, как правило, из фибробластов и не имели морфологического сходства с формирующимися костными узелками. Реакция на ЩФ, обычно слабая, встречалась лишь в отдельных клетках или в небольших группах клеток и в целом не отличалась по выраженности от наблюдаемой в контрольной среде (рисунок 24 ж, 3).

Таким образом, МСК из печени зародышей проявляли крайне слабые остеогенные потенции: несмотря на происходящие в присутствии индукторов изменения в морфологии клеток и активности ЩФ, могущие отражать начальные стадии дифференцировки, образования зрелых костных узелков с выраженной минерализацией внеклеточного матрикса не происходило [Паюшина и др., 2011]. Слабую способность МСК зародышевой печени к остеогенезу отмечают и некоторые другие авторы [in't Anker et al., 2003; Fromigue et al., 2008], хотя есть и сообщения об эффективной терминальной дифференцировке этих клеток в остеогенной среде [Götherström et al., 2003, Guillot et al., 2007]. Возможно, расхождения в результатах вызваны различиями в источниках клеток (вид и линия животных, стадия развития) и условиях экспериментов.



Рисунок 24. Остеогенная дифференцировка МСК зародышевой печени крысы: а – МСК 14-суточных зародышей, 13 суток в контрольной среде; б – МСК 14-суточных зародышей, 13 суток в остеогенной среде; в – МСК 14-суточных зародышей, 21 сутки в остеогенной среде; г – МСК 16-суточных зародышей, 14 суток в контрольной среде; д – МСК 16-суточных зародышей, 14 суток в остеогенной среде; е – МСК 16-суточных зародышей, 21 сутки в остеогенной среде; ж – МСК 20-суточных зародышей, 14 суток в контрольной среде; з – МСК 20-суточных зародышей, 14 суток в остеогенной среде. Цитохимическая реакция на ЩФ (a, б, г, д, ж, з), окрашивание ализариновым красным S (в, е), ядра докрашены гематоксилином. Увел.: об. х4, ок.х10.

Проведенное нами сравнение дифференцировки МСК от зародышей разных сроков развития выявило наиболее выраженные остеогенные потенции у клеток 16-суточных зародышей, в печени которых активно идет гемопоэз и присутствует большое число КОЕ-Ф (см. раздел 1.1). Клетки 20-суточных плодов практически не дифференцировались, что могло указывать на затухание остеогенных потенций МСК из печени в позднем пренатальном онтогенезе. В качестве возможной причины этого затухания можно предположить снижение содержания остеогенных клеток в печени в связи с их гибелью или миграцией в костный мозг либо потерю ими способности к остеогенезу под влиянием изменений в микроокружении.

4.1.1.3. Селезенка

В контрольной среде без индукторов МСК из селезенки 20-суточных плодов, подобно клеткам из других изученных источников, формировали монослой типичных фибробластов; некоторые из них, расположенные поодиночке или рыхлыми группами, слабо окрашивались на ЩФ (рисунок 25 а). После 15-21 суток воздействия индукционной среды картина была подобна таковой в культуре клеток из печени 16-суточных зародышей: встречались мелкие скопления базофильных клеток фибробластоподобной или приблизительно кубической формы, имеющие умеренную или высокую плотность и морфологически отличные от очагов остеогенеза в культуре костного мозга. Многие, но не все такие скопления полностью или частично окрашивались на ЩФ со значительно большей интенсивностью, чем клетки в культурах без индукторов (рисунок 25 б). Крайне редко в них мог быть выявлен слабо минерализованный матрикс; в подавляющем большинстве очагов соли Ca^{2+} не выявлялись (рисунок 25 в, г).

МСК из **селезенки половозрелых крыс** за 21 сутки инкубации в индукционной среде не приобретали явных признаков остеогенеза, отличаясь от культивируемых без индукторов лишь менее равномерным расположением клеток и появлением единичных фибробластов со слабой реакцией на ЩФ (в контрольных культурах реакция отсутствовала) (рисунок 25 д, е).

Полученные результаты могут указывать на то, что стромальные клетки селезенки, как и печени, теряют остеогенные потенции в ходе онтогенеза. Возможно, об этом говорят и данные других авторов, согласно которым у мышей через 14 суток после рождения остеогенные потенции МСК из костного мозга и селезенки сходны [Hegyi et al., 2010], а у половозрелых мышей МСК из селезенки откладывают в индукционной среде значительно меньше минерализованного матрикса, чем клетки из костного мозга [da Silva Meirelles et al., 2006].

Таким образом, сравнение способности МСК из изучаемых источников к индуцированному остеогенезу выявило картину, подобную наблюдаемой при анализе активности ЩФ в первичной культуре: выраженные остеогенные потенции присущи только



Рисунок 25. Остеогенная дифференцировка МСК селезенки крысы: а – МСК 20суточных плодов, 15 суток в контрольной среде; б, в - МСК 20-суточных плодов, 15 суток в остеогенной среде; г - МСК 20-суточных плодов, 21 сутки в остеогенной среде; д - МСК половозрелых животных, 21 сутки в контрольной среде; е – МСК половозрелых животных, 21 сутки в остеогенной среде. Реакция на ЩФ (а, б, д, е), окрашивание ализариновым красным S (в, г), ядра докрашены гематоксилином. Увел.: об. х4, ок.х10 (а, б, г, д, е); об. х10, ок. х10 (в, г).

клеткам зрелого костного мозга, а МСК из печени и селезенки к терминальному остеогенезу практически неспособны (хотя в период активного гемопоэза в этих органах они проявляют некоторые признаки начальных стадий костной дифференцировки). Очевидно, потенции МСК, локализованных в различных органах, отражают их разное функциональное значение: участие в формировании костной ткани является одной из основных функций МСК костного мозга, а в печени или селезенке остеогенез биологически нецелесообразен.

4.1.2. Остеогенная дифференцировка под влиянием факторов роста

Наши эксперименты показали слабую выраженность костной дифференцировки МСК из пренатальных органов (в частности, печени) по сравнению с таковой в культуре клеток зрелого костного мозга в стандартной индукционной среде. Однако остается неясным, связано ли это с неспособностью МСК из кроветворных органов зародыша к терминальной дифференцировке в костную ткань, или же их остеогенные потенции могут реализоваться под влиянием других индукторов. С учетом актуальности клеточной терапии для репарации костных дефектов оценка возможности повышения остеогенных потенций МСК приобретает не только теоретическое, но и практическое значение. Для прояснения этого вопроса мы изучили возможность усиления остеогенной дифференцировки МСК из костного мозга и зародышевой печени под влиянием гуморальных факторов, известных как стимуляторы остеогенеза.

4.1.2.1. Влияние bFGF и BMP-2 на дифференцировку МСК в остеогенной среде

В качестве дополнительных стимуляторов остеогенеза нами были избраны bFGF и BMP-2. Известно, что bFGF влияет на остеогенез, активируя фактор транскрипции Runx2 - ключевой регулятор созревания и пролиферации остеобластов [Teplyuk et al., 2009]. Усиленная дифференцировка MCK костного мозга описана как при внесении bFGF в остеогенную среду [Pitaru et al., 1993; Zhang et al., 2002], так и при стандартной индукции костной дифференцировки клеток, размноженных в его присутствии [Hanada et al., 1997; Martin et al., 1997]. Способность усиливать дифференцировку MCK костного мозга в остеогенной среде показана и для BMP-2 [Wang et al., 2010]. Сообщалось, что он повышает уровень экспрессии ими ЩФ и остеокальцина, а также стимулирует регенерацию кости *in vivo* [Seol et al., 2008].

Клетки костного мозга половозрелых крыс или печени 16-суточных зародышей культивировали в остеогенной среде с добавлением 2,5 нг/мл bFGF или 100 нг/мл BMP-2; контролем служила культура тех же клеток в стандартной остеогенной среде. МСК костного мозга в индукционной среде без изучаемых факторов через 14-15 суток формировали плотные скопления из 20-70 кубических остеобластоподобных клеток с интенсивной реакцией на ЩФ (рисунок 26 а). В некоторых клетках очагов остеогенеза присутствовал остеокальции (рисунок А.9 а), но минерализация еще не начиналась. bFGF существенно увеличивал число костных узелков и их размеры: в его присутствии многие очаги остеогенеза содержали по 200-300 клеток (рисунок 26 б). В большинстве клеток этих очагов выявлялся остеокальции (рисунок А.9 б). Таким образом, наши результаты подтверждают описанное другими авторами [Pitaru et al., 1993; Hanada et al., 1997; Zhang et al., 2002] усиление остеогенной дифференцировки MCK
костного мозга под действием bFGF. BMP-2 влиял на их дифференцировку существенно слабее. По сравнению с культурой в стандартной остеогенной среде реакция на ЩФ была ярче, а окрашенные клеточные скопления несколько мельче, однако отмечалось больше скоплений, содержащих только окрашенные клетки без примеси неокрашенных (рисунок 26 в). Единичные участки были минерализованы. Несмотря на важную роль BMP-2 в регуляции остеогенеза [Edgar et al., 2007], его слабое по сравнению с bFGF влияние на индуцированную дексаметазоном костную дифференцировку МСК крысы отмечают и другие авторы [Hanada et al., 1997].



Рисунок 26. Остеогенная дифференцировка МСК костного мозга: а – в стандартной индукционной среде; б – в индукционной среде с bFGF; в – в индукционной среде с BMP-2. Реакция на ЩФ, ядра докрашены гематоксилином. Увел.; об. х4, ок.х10.

В контрольных культурах клеток из **печени зародышей** в стандартной остеогенной среде типичные костные узелки отсутствовали, а на ЩФ окрашивались в основном скопления фибробластоподобных клеток, реже в их центре присутствовали клетки округлой или приблизительно кубической формы (рисунок 27 а). Эффект как bFGF, так и BMP-2 был выражен слабо и проявлялся в некотором повышении плотности скоплений окрашенных на ЩФ клеток и интенсивности реакции в них (рисунок 27 б, в). Таким образом, эти факторы не оказывали существенного влияния на костную дифференцировку МСК зародышевой печени.



Рисунок 27. Остеогенная дифференцировка МСК печени 16-суточных зародышей крысы: а – в стандартной индукционной среде; б – в индукционной среде с bFGF; в – в индукционной среде с BMP-2. Реакция на ЩФ, ядра докрашены гематоксилином. Увел.; об. x4, ок.x10.

4.1.2.2. Совместное культивирование МСК костного мозга и зародышевой печени в остеогенной среде

Один из способов индукции той или иной дифференцировки МСК состоит в их бесконтактном сокультивировании с более зрелыми клетками. Этот подход был успешно применен для получения из МСК клеток с фенотипом теноцитов [Lovati et al., 2012], гепатоцитов [Bornstein et al., 2012], хондроцитов [Aung et al., 2011] и почечного эпителия [Singaravelu, Padanilam, 2009], причем в последних двух случаях дифференцировка МСК не происходила при их культивировании в среде, кондиционированной соответствующими



зрелыми клетками. Сообщалось и стимуляции остеогенной дифференцировки МСК, сокультивируемых с остеобластами [Wang et al., 2007; Ilmer et al., 2009; Lu et al., 2011].

Как известно, костная дифференцировка МСК сопровождается продукцией ими регуляторных факторов, в частности, белков семейства BMP [Edgar et al., 2007]. Мы исследовали, могут ли эндогенные факторы, выделяемые

Рисунок 28. Результаты сокультивирования МСК печени 16-суточных зародышей и зрелого костного мозга крысы в остеогенной среде: а - отложение минерализованного матрикса клетками костного мозга; б – дифференцировка МСК печени зародышей в совместной культуре; в – дифференцировка МСК печени зародышей в отсутствие клеток костного мозга. а', б', в' – клетки из тех же источников в стандартной ростовой среде без индукторов остеогенеза. Окрашивание ализариновым красным S (a, a'); реакция на ЩФ с докрашиванием гематоксилином (б, б', в, в'). Увел.: об. х4, ок. х10 (б, б', в, в'). дифференцирующимися

МСК костного мозга, способствовать реализации потенций остеогенных клеток зародышевой ИЗ печени. С этой целью было проведено совместное культивирование клеток из 16-суточных печени зародышей и костного мозга

половозрелых крыс через полупроницаемую мембрану, обеспечивающую свободную диффузию растворимых молекул. МСК костного мозга помещали на поверхность мембранных вкладышей, МСК из печени зародышей – на дно лунки; результаты оценивали после 14-17 суток сокультивирования в остеогенной среде. Контролем служили МСК из печени, подвергнутые стандартной индукции остеогенеза (в отсутствие МСК костного мозга), и совместные культуры в среде без индукторов. Окрашивание мембранных вкладышей с клетками костного мозга ализариновым красным S показало отложение ими в остеогенной среде значительного количества минерализованного матрикса, свидетельствующее о терминальной дифференцировке (рисунок 28 а). Однако морфология сокультивируемых с ними клеток зародышевой печени и активность ЩФ в них не отличались от таковых при стандартной индукции остеогенной дифференцировки этих клеток в отсутствие МСК костного мозга, что указывало на отсутствие стимулирующего эффекта со стороны последних (рисунок 28 б, в).

Таким образом, изученные гуморальные факторы, как добавляемые к остеогенной среде, так и выделяемые дифференцирующимися клетками костного мозга, не влияли существенным образом на МСК из печени зародыша, что, возможно, говорит о неспособности последних к полной реализации остеогенной программы. Выяснение причин различия в остеогенных потенциях МСК костного мозга и зародышевой печени требует дальнейших исследований.

4.2. Адипогенез

4.2.1. Адипогенная дифференцировка в стандартной индукционной среде

4.2.1.1. Костный мозг

Культивирование МСК костного мозга половозрелых крыс на 1-м пассаже в адипогенной среде уже через 3-4 дня приводило к появлению единичных клеток с жировыми включениями. После 10-12 суток индукции выявлялись многочисленные мультилокулярные адипоциты на разных стадиях накопления жира (рисунок 29 а). Одни из них сохраняли морфологию фибробластов и содержали мелкие суданофильные включения, другие имели округлую или овальную форму, и вся их цитоплазма была заполнена множеством крупных капель жира. Унилокулярные клетки с одной крупной жировой вакуолью и периферическим расположением ядра были крайне редки. Адипоциты обычно располагались группами, содержащими от 3-5 до нескольких десятков, иногда сотен клеток [Кожевникова и др., 2008 а]. После 21 суток индукции жировые клетки находились в основном на поздних стадиях дифференцировки, однако к этому сроку их становилось существенно меньше, чем через 12 дней (видимо, за счет открепления с субстрата), они образовали мелкие кластеры и часто имели признаки дегенерации (рисунок 29 б).

В культуре МСК из кости 20-суточных плодов в индукционной среде также наблюдался выраженный адипогенез. Через 4-6 суток индукции появлялись одиночные или расположенные рыхлыми кластерами клетки фибробластоподобной или округлой формы, содержащие окрашенные жировым красным О включения. После 10-12 суток пребывания в адипогенной среде очаги дифференцировки представляли собой крупные скопления адипоцитов, в основном зрелых, округлой формы, с множественными жировыми вакуолями (рисунок 29 в). Судя по срокам образования, числу и степени зрелости жировых клеток, адипогенные потенции МСК из развивающегося и зрелого костного мозга были сопоставимы. Иммуноцитохимическое окрашивание на белок-транспортер жирных кислот в адипоцитах ALBP (рисунок A.10) подтвердило дифференцировку МСК из кости зародышей в жировые клетки. Этот белок был выявлен в цитоплазме округлых клеток с мелкими плотными ядрами и множественными вакуолями (очевидно, зрелых адипоцитов). Некоторые клетки, сохраняющие морфологию фибробластов, содержали ALBP в ядрах, что может быть объяснено его ролью транспортера жирных кислот в ядро, где они выступают в качестве специфических лигандов для ядерного рецептора PPARy [Helledie et al., 2002]. Характер окрашивания клеток антителами к ALBP был сходен с показанным ранее для дифференцирующихся в адипогенном направлении МСК зрелого костного мозга [Кожевникова и др., 2009].

4.2.1.2. Печень зародышей

МСК из печени **14-суточных зародышей**, проинкубированные в адипогенной среде 16 дней, образовывали лишь немногочисленные клетки с включениями нейтральных жиров, расположенные поодиночке или группами по 3-6 и практически никогда не образующие более крупных скоплений. Как правило, они сохраняли фибробластоподобную форму и находились на начальных стадиях накопления жира; реже встречались зрелые мультилокулярные адипоциты, заполненные крупными жировыми каплями (рисунок 29 г).

В культуре клеток из печени **16-суточных зародышей** адипогенез протекал более интенсивно. После 14-18 суток индукции обнаруживались многочисленные клетки с большим или меньшим количеством жировых капель. Эти клетки были, как правило, более мелкими и вытянутыми, чем при дифференцировке МСК костного мозга, и образовывали более плотные группы, внутри которых тесно контактировали с фибробластами (рисунок 29 д). Реже встречались рыхлые скопления крупных округлых адипоцитов, аналогичные наблюдаемым в культурах МСК костного мозга. Преобладали кластеры из 5-50 жировых клеток, но встречались



Рисунок 29. Дифференцировка МСК крысы в адипогенной среде: а – МСК из зрелого костного мозга, 12 суток индукции; б – МСК из зрелого костного мозга, 21 сутки индукции; в – МСК из кости 20-суточных зародышей, 12 суток индукции; г – МСК из печени 14-суточных зародышей, 16 суток индукции; д – МСК из печени 16-суточных зародышей, 14 суток индукции; е – МСК из печени 20-суточных зародышей, 16 суток индукции; ж – МСК из селезенки 20-суточных зародышей, 16 суток индукции; селезенки 20-суточных зародышей, 16 суток индукции; з – МСК из печени 20-суточных зародышей, 16 суток индукции; м – МСК из селезенки 20-суточных зародышей, 16 суток индукции; и суданом III и суданом IV (а, б, д) или жировым красным O (в, г, е, ж, з), Увел.: об. х10, ок.х10.

и более крупные очаги адипогенеза без четких границ, насчитывающие сотни клеток. Через 18 дней дифференцировки число адипоцитов было, как правило, меньшим, чем через 14.

При культивировании МСК от **20-суточных плодов** в адипогенной среде число клеток, содержащих нейтральные жиры, через 16 суток индукции было невелико. Эти клетки, одиночные или собранные в рыхлые скопления, имели типичную для фибробластов вытянутую или распластанную форму, а жировые включения в них были, как правило, мелкими и немногочисленными (рисунок 29 е). Более зрелые адипоциты практически отсутствовали.

Подсчет жировых клеток и их кластеров после 16 суток индукции дифференцировки (таблица 9) подтвердил различия в адипогенных потенциях МСК из печени на разных сроках пренатального развития: эти потенции, слабые у клеток 14-суточных зародышей, достигали максимума после 16 суток эмбриогенеза и значительно снижались к 20 суткам [Паюшина и др., 2011]. Динамика изменения способности МСК из печени к адипогенезу была сходна с таковой для их остеогенных потенций и коррелировала с активностью гемопоэза в печени и эффективностью клонирования КОЕ-Ф. При этом даже на стадии развития, характеризующейся наибольшей способностью МСК из печени к адипогенезу (16 суток эмбриогенеза) их дифференцировка была выражена слабее по сравнению с МСК костного мозга: жировые клетки появлялись позднее, а их морфологические особенности могли отражать меньшую зрелость. Относительно слабые адипогенные потенции МСК печени зародышей в сравнении с таковыми клеток из зрелого костного мозга были отмечены и другими авторами [Ryden et al., 2003].

Таблица 9. Адипогенная дифференцировка МСК из печени зародышей в индукционной среде

Срок эмбриогенеза	Число адипоцитов на 1 см ²	Число кластеров адипоцитов (≥10 клеток) на 1 см ²
14 суток	144,09±26,59	0,10±0,06
	305,91±61,36	$0,00\pm7,67$
16 суток	1086,36±175,91	8,22±0,99
	2098,64±325,45	10,94±0,79
20 суток	468,18±43,18	0,78±0,22
	424,09±35,00	3,81±0,37

Примечание. Анализ проводили после 16 суток культивирования в адипогенной среде. Адипоциты идентифицировали по наличию включений, окрашенных жировым красным О.

4.2.1.3. Селезенка

При культивировании МСК из селезенки **20-суточных плодов** в индукционной среде в течение 16-21 суток интенсивного адипогенеза отмечено не было. Малочисленные клетки с

жировыми включениями, чаще фибробластоподобные, реже с морфологией зрелых мультилокулярных адипоцитов, располагались поодиночке или группами по 3-5 клеток (рисунок 29 ж). После 3 недель индукции в культуре МСК селезенки **половозрелых крыс** адипогенез был представлен лишь одиночными клетками угловатой или отростчатой формы, содержащими мелкие капли жира и не образующими скоплений (рисунок 29 з). Зрелые адипоциты отсутствовали.

Таким образом, способность к жировой дифференцировке у МСК из зародышевой и особенно из зрелой селезенки была выражена слабо. Наши результаты согласуются с имеющимися в литературе данными о слабых адипогенных потенциях МСК из селезенки плодов человека по сравнению с клетками зародышевых костного мозга и печени [in't Anker et al., 2003], хотя сообщалось также и о том, что у половозрелой мыши адипогенные потенции МСК из селезенки и костного мозга сопоставимы [Hegyi et al., 2010].

4.2.2. Адипогенная дифференцировка, наблюдаемая при культивировании МСК в среде без индукторов и в остеогенной среде

В культурах МСК из кости 20-суточных плодов адипогенез происходил не только под действием соответствующей индукционной среды, но и спонтанно. При их культивировании в среде без индукторов уже через 7 суток появлялись крупные скопления адипоцитов, в том числе зрелых, целиком заполненных жировыми включениями. После 12-21 суток культивирования многочисленные очаги дифференцировки содержали сотни плотно расположенных мультилокулярных жировых клеток овальной или округлой формы (рисунок А.11 а). Возможно, интенсивный спонтанный адипогенез в культурах клеток из зародышевой кости связан с присутствием среди них коммитированных адипогенных предшественников. В культурах МСК из остальных источников (зрелый костный мозг, печень зародышей, селезенка) дифференцировка в адипогенном направлении отсутствовала или спонтанная была представлена единичными клетками с мелкими включениями жира.

Адипогенная дифференцировка МСК из костного мозга и зародышевой кости часто наблюдалась при их инкубации в остеогенной среде, вероятно, под влиянием входящего в ее состав дексаметазона, что согласуется с данными других авторов [Grigoriadis et al., 1988; Zvaifler et al., 2000]. В культурах зрелого костного мозга первые небольшие группы клеток с умеренным количеством мелких жировых капель появлялись через 4-5 суток после начала индукции остеогенеза. К 7-8 суткам индукции число адипоцитов и содержание в них жира возрастали, однако последующее формирование костных узелков сопровождалось постепенным исчезновением адипоцитов. На стадии минерализации костного матрикса (14-21 суток

индукции) жировые клетки, как правило, уже не выявлялись. К этому сроку они сохранялись лишь в тех культурах, где был слабо выражен остеогенез, и могли располагаться как вблизи костных узелков или внутри их, так и вне связи с очагами остеогенеза (рисунок А.11 б). В культурах, не содержащих или почти не содержащих минерализованных костных узелков, интенсивность адипогенеза иногда бывала сопоставима с таковой в адипогенной среде.

Клетки из зародышевой кости в остеогенной среде также образовывали скопления из десятков или сотен адипоцитов, заполненных крупными каплями жира. Как правило, очаги адипогенеза в остеогенной среде отличались от формирующихся спонтанно в среде без индукторов большей зрелостью жировых клеток и более крупным размером их скоплений. В отличие от культур зрелого костного мозга, многочисленные адипоциты сохранялись и после 19-21 суток индукции остеогенеза (рисунок А.11 в), часто колокализуясь с костными узелками.

В литературе неоднократно была описана обратная связь остео- и адипогенной дифференцировки МСК: подавление адипогенеза В условиях. благоприятствующих остеогенезу, и наоборот [Gimble et al., 1995; Jaiswal et al., 2000; Kha et al., 2004]. По-видимому, это связано с существованием общего предшественника костной и жировой ткани, избирающего тот или иной путь дифференцировки в зависимости от условий. Так, анализ профиля экспрессии генов в процессе дифференцировки МСК показывает, что остео-и адипогенез связаны между собой и представляют ветвь, отдельную от хондрогенеза. Ранние стадии этих дифференцировок требуют активации одного и того же набора генов, тогда как факторы более поздних стадий дифференцировки различаются [Liu et al., 2006]. Наши наблюдения адипогенеза в остеогенной среде иллюстрируют подобную взаимосвязь между двумя направлениями дифференцировки: в популяции МСК зрелого костного мозга начало активного остеогенеза сопровождается исчезновением адипогенеза, а в культурах клеток кости плодов (а иногда и зрелого костного мозга), где остеогенез выражен слабо, образуются многочисленные адипоциты. Один из возможных механизмов реципрокной регуляции адипо- и остеогенеза может быть связан с тем, что продукты клеток, образовавшихся в результате одной дифференцировки, подавляют другую. Показано, в частности, что продуцируемая адипоцитами липопротеинлипаза связывает сортилин, необходимый для минерализации костного матрикса [Maeda et al., 2002]. Известно также, что фактор транскрипции PPAR-у, являющийся одним из центральных регуляторов жировой дифференцировки, не только активирует гены. ответственные за адипогенез, но и подавляет остеогенез, тогда как активация Runx2 наряду с запуском остеогенной программы может ингибировать адипогенную [Zhang et al., 2012 b].

Следует отметить, что жировая дифференцировка МСК в остеогенной среде значительно усиливалась в присутствии 2,5 нг/мл bFGF, известного как стимулятор не только остеогенеза, но и адипогенеза [Neubauer et al., 2004]. При включении bFGF в остеогенную среду в культуре

152

клеток зрелого костного мозга появлялись крупные скопления и целые поля зрелых адипоцитов. Число их было наибольшим после 8 суток культивирования (рисунок А.11 г); после 13 суток оно снижалась, и на месте скоплений адипоцитов формировались очаги остеогенеза, вокруг и внутри которых сохранялись жировые клетки. Сочетание остеогенной среды с bFGF вызывало появление множества крупных скоплений адипоцитов также и в культуре MCK из печени 16-суточных зародышей (рисунок А.11 д), тогда как в стандартной остеогенной среде жировая дифференцировка клеток из этого источника не наблюдалась.

Адипогенная дифференцировка МСК зародышевой печени была также отмечена в некоторых экспериментах по их культивированию в среде с 2% сыворотки, 10 нг/мл EGF, 10нг/мл bFGF, 1% ITS+1 и 50 мкг/мл 2-фосфо-L-аскорбата натрия после 24 обработки 3 мкМ 5азацитидином с целью индукции миогенеза (см. раздел 4.4.2). В этих условиях МСК из печени 17-суточных зародышей иногда формировали через 12-14 суток компактные скопления из 50-100 округлых клеток с многочисленными крупными каплями жира (рисунок A.11 е). В качестве индуктора адипогенеза в данном случае мог выступать 5-азацитидин [Taylor, Jones, 1979; Wakitani et al., 1995], эффект которого был усилен входящим в среду bFGF. В культуре тех же клеток в стандартной ростовой среде адипоциты отсутствовали.

4.3. Хондрогенез

Хотя способность к хондрогенезу является одним из основных критериев для отнесения клеток к категории MCK [Dominici et al., 2006], ввиду технических трудностей, связанных с его индукцией, многие исследователи при оценке потенциала MCK ограничиваются анализом остеогенной и адипогенной дифференцировки [in't Anker et al., 2003; Stenderup et al., 2003; Tokalov et al., 2007; Hegyi et al., 2010; Vishnubalaji et al., 2012].

Для сравнительного изучения хондрогенных потенций МСК из различных кроветворных органов мы использовали клетки из печени 16-суточных зародышей, селезенки 20-суточных зародышей и зрелого костного мозга. Их помещали в микромассовую культуру с индукторами хондрогенеза, основным из которых являлся TGF- β 1; в некоторых опытах в индукционную среду наряду с ним включали и BMP-2, известный своей способностью усиливать хрящевую дифференцировку MCK [Yoshimura et al., 2007; Russell et al., 2010; Weiss et al., 2010]. Присутствие хрящевого матрикса оценивали после 3 недель культивирования, выявляя гликозаминогликаны по окрашиваемости толуидиновым синим или альциановым синим.

4.3.1. Костный мозг

Спустя сутки после помещения в микромассовую культуру осадки клеток, полученные путем их центрифугирования в хондрогенной или контрольной среде, откреплялись от дна пробирки и имели вид свободно плавающих сферических агрегатов диаметром около 0,5 мм, не увеличивавшихся за последующие 3 недели. После 21 суток инкубации в среде с TGF-β1 эти агрегаты состояли из округлых клеток с эксцентрично расположенными пузыревидными ядрами и часто с вакуолизированной цитоплазмой. В центре некоторых агрегатов присутствовала бесструктурная масса, не содержащая клеток. При окрашивании толуидиновым синим тотальных препаратов и срезов клеточных конгломератов отмечалась метахроматическая фиолетовая окраска отдельных клеток и их групп, свидетельствующая о присутствии гликозаминогликанов. Метахроматически окрашенные клетки располагались на периферии агрегатов 3-10 рядами, образующими прерывистый слой неравномерной толщины; остальные клетки ортохроматически окрашивались в голубой цвет (рисунок 30 б, в). Результаты окрашивания альциановым синим также указывали на присутствие небольшого количества гликозаминогликанов, главным образом в периферическом слое конгломератов (рисунок 30 г). Иммуногистохимический анализ выявил на периферии и в глубине агрегатов локальные участки отложения коллагена II типа (рисунок 30 д). Введение в состав хондрогенной среды ВМР-2 в качестве дополнительного индуктора не приводило к усилению дифференцировки. Клеточные агрегаты, формировавшиеся в культурах без TGF-β1, представляли собой более рыхлые, чем в среде с индуктором, скопления округлых клеток, практически не демонстрирующие метахромазии при окрашивании толуидиновым синим (рисунок 30 а).

Таким образом, ни в присутствии в качестве индуктора хондрогенеза TGF-β1, ни при сочетании его с BMP-2 мы не наблюдали образования типичной структуры терминально дифференцированного хряща, описанной при индукции хондрогенной дифференцировки MCK из костного мозга человека [Yoo et al., 1998; Pittenger, Marshak, 2001] или кролика [Johnstone et al., 1998]. Наблюдаемая картина формирования клеточных конгломератов с умеренным содержанием гликозаминогликанов в поверхностном слое была подобна приводимой в публикации авторов, проводивших аналогичные эксперименты на клетках крысы [Neuhuber et al., 2008]. В другой работе [Zheng et al., 2007] сообщается о потере хондрогенных потенций МСК костного мозга крысы в ходе постнатального онтогенеза: в противоположность клеткам недельных животных, MCK от 12-недельных крыс (что приблизительно соответствует возрасту использованных нами животных) не откладывают в хондрогенной среде большого количества хрящевого матрикса. Впрочем, сообщалось и о сопоставимых хондрогенных потенциях MCK из зрелого костного мозга крысы и человека [Zavan et al., 2007], однако условия культивирования

клеток в этой работе (применение трехмерных каркасов на основе гиалуронана) отличались от стандартной микромассовой культуры, что могло влиять на выраженность дифференцировки.



Рисунок 30. Хондрогенез в микромассовой культуре МСК костного мозга крысы (21 сутки индукции): а – тотальный препарат клеточного агрегата, образовавшегося в контрольной среде; б – срез агрегата, образовавшегося в среде с TGF- β 1; в, г - тотальные препараты агрегатов, образовавшихся в среде с TGF- β 1; д – отложение коллагена II типа в присутствии TGF- β 1; д' – совмещение изображения результата иммуномечения и ядер, окрашенных Hoechst 33342. Окраиивание толуидиновым синим (а-в), альциановым синим (г); непрямое иммунофлуоресцентное окрашивание криостатных срезов с применением флуорохрома Alexa 488 (д, д'). Увел.: об. x20, ок. x10 (а, в); об. x10, ок. x10 (б); об. x40, ок. x10 (г).

4.3.2. Печень зародышей

МСК из печени 16-суточных зародышей, помещенные в индукционную среду с TGF-β1 или в контрольную среду без этого фактора, формировали в микромассовой культуре

клеточные агрегаты, по размеру, форме и структуре подобные образуемым в тех же условиях клетками костного мозга. Опытные образцы отличались от контрольных более плотной консистенцией; при окрашивании толуидиновым синим внешний слой части из них демонстрировал метахроматическую окраску всех или лишь некоторых клеток, тогда как контрольные агрегаты окрашивались только ортохроматически (рисунок 31 а-г). Окрашивание альциановым синим не выявило различий между культурами, инкубируемыми с TGF- β 1 и без него: в обоих случаях слабо окрашивались некоторые участки клеточного конгломерата.



Рисунок 31. Хондрогенез в микромассовой культуре МСК печени 16-суточных зародышей крысы: а – срез клеточного агрегата в контрольной среде, 21 сутки роста, б – тотальный препарат агрегата в контрольной среде, 20 суток роста; в – срез агрегата в среде с TGF-β1, 21 сутки индукции; г – тотальный препарат агрегата в среде с TGF-β1, 20 суток индукции; д, е – тотальный препарат клеточного в среде с TGF-β1 и BMP-2, 21 сутки индукции. Окрашивание толуидиновым синим. Увел.: а, в, д – об. x10, ок. x10; б, г, е - об. x20, ок. x10.

Коллаген II типа в культурах клеток, индуцированных к хондрогенезу, обнаружен не был.

Сходные результаты наблюдались при добавлении в индукционную среду ВМР-2: клеточные агрегаты были плотнее, чем без индукторов, и в некоторых из них присутствовали компактные метахроматически окрашенные участки (рисунок 31 д, е). Однако в большинстве образцов метахромазия при окрашивании толуидиновым синим отсутствовала.

Мы не обнаружили в литературе данных о выраженности хондрогенных потенций МСК из печени зародышей крысы в сравнении с костным мозгом половозрелого животного, однако сообщалось, что в пренатальном онтогенезе собаки МСК из печени, в отличие от выделенных из костного мозга, к хондрогенезу неспособны [Wenceslau et al., 2011], тогда как у человека хондрогенные потенции МСК из печени плодов сопоставимы с таковыми клеток как зародышевого, так и зрелого костного мозга [Campagnoli et al., 2001; Guillot et al., 2007]. Наши результаты указывают на то, что у крысы МСК зародышевой печени способны к хондрогенезу в меньшей степени, чем клетки зрелого костного мозга: культуры из этого источника лишь изредка приобретали под влиянием TGF-β1 признаки дифференцировки в данном направлении, состоящие в накоплении гликозаминогликанов во внеклеточном матриксе. При этом, как и в случае МСК костного мозга, BMP-2 не вызывал существенного усиления хондрогенеза.

4.3.3. Селезенка зародышей

Конгломераты, формируемые MCK зародышевой селезенки в микромассовой культуре с TGFβ1 и BMP-2 или без индукторов хондрогенеза, не отличались по форме и размеру от образуемых клетками из других сравниваемых источников, но были более плотными, особенно в среде с индукторами. Все контрольные образцы и большинство сформированных в хондрогенной среде состояли из мелких округлых клеток без видимых отложений матрикса и окрашивались толуидиновым синим ортохроматически (рисунок 32 a, б). Лишь в некоторых культурах, инкубировавшихся с индукторами, внешний слой агрегатов содержал очень мелкие метахроматически окрашенные участки из нескольких клеток, окруженных межклеточным веществом (рисунок 32 в), то есть наблюдались минимальные признаки хондрогенеза.

Таким образом, сравнение способности МСК из зрелого костного мозга и зародышевых печени и селезенки к хондрогенезу показало ее наибольшую выраженность у клеток из костного мозга, не приобретавших морфологических признаков хрящевой ткани, но в большинстве случаев синтезировавших гликозаминогликаны. В культурах МСК из остальных органов цитохимические признаки хондрогенеза наблюдались редко и обычно были слабыми, особенно в случае селезенки. Впрочем, вопрос о соотношении хондрогенных потенций МСК из печени и селезенки требует дополнительного исследования на большем количестве материала.



Рисунок 32. Хондрогенез в микромассовой культуре МСК селезенки 20-суточных зародышей крысы под влиянием TGF-β1 и BMP-2 (21 сутки индукции): а – срез клеточного агрегата, образовавшегося в контрольной среде, б, в – срезы агрегатов, образовавшихся в индукционной среде (метахроматически окрашенный участок отложения гликозаминогликанов показан стрелкой). Окрашивание толуидиновым синим. Увел.: а, б – об. x10, ок. x10; в - об. x20, ок. x10.

4.4. Миогенез

Данные о возможности дифференцировки МСК различного органного происхождения в мышечную ткань противоречивы [Liu et al., 2003; Gang et al., 2004; Krupnick et al., 2004; Balana et al., 2006; Burlacu, 2006; Chan et al., 2006]. Для прояснения вопроса о миогенных потенциях МСК из костного мозга и зародышевой печени мы провели ряд экспериментов по индукции их мышечной дифференцировки, используя различные протоколы с применением химических индукторов либо гуморальных регуляторов, продуцируемых клетками скелетных мышц (путем совместного культивирования или добавления кондиционированной среды).

4.4.1. Костный мозг

В качестве индуктора миогенеза мы применяли 5-азацитидин, который, по данным ряда авторов, вызывает дифференцировку МСК в скелетную [Krupnick et al., 2004] или сердечную [Makino et al., 1999; Duan et al., 2005; Dong et al., 2006; Ye et al., 2006] мышечную ткань. Впрочем, другие авторы сообщают о неэффективности подобного метода индукции миогенной дифференцировки МСК крысы [Liu et al., 2003] и человека [Balana et al., 2006; Chan et al., 2006]. Поскольку миогенные потенции МСК могут зависеть от длительности предшествующего культивирования, мы использовали культуры 4-го пассажа, на котором клетки из костного

мозга замедляют рост и, по некоторым данным, могут быть эффективно индуцированы к миогенезу, в отличие от активно пролиферирующих клеток 1-го пассажа [Zhang et al., 2005 a].

Обработка МСК 10 мкМ 5-азацитидином в течение 24 ч не приводила в последующие 19 суток к существенному изменению морфологии клеток или появлению в них десмина. Результат был отрицательным и при обработке 5-азацитидином МСК, культивируемых на фибронектине или ламинине (рисунок 33), хотя данные о роли этих белков в развитии скелетных мышц [Kühl et al., 1986; von der Mark, Ocalan, 1989; MacCalman et al., 1992; Burkin, Kaufman, 1999; Eberli et al., 2009] позволяли предположить их возможное стимулирующее влияние на эффективность индукции миогенеза. Сочетание 10 мкМ 5-азацитидина с 10 нг/мл bFGF, применяемое некоторыми авторами для индукции кардиомиогенной дифференцировки MCK костного мозга человека [Xu et al., 2004], также не приводило к миогенезу.



Рисунок 33. Отсутствие миогенеза через 19 суток после индукции дифференцировки МСК костного мозга (4-й пассаж) 5-азацитидином: а – на пластике; б – на фибронектине; в – на ламинине. Окрашивание азур-эозином. Увел.: об. 10х, ок. x10.

4.4.2. Печень зародышей

Вопрос о миогенных потенциях МСК из печени зародышей приобретает особый интерес в связи с обнаруженным нами спонтанным формированием миотуб в ее первичной культуре. Хотя наиболее вероятным источником этих миотуб являются коммитированные к миогенезу МуоD⁺ клетки, присутствующие в нативной печени (см. рисунок А.4), нельзя полностью исключить и возможность их образования в результате дифференцировки МСК *in vitro*, тем более что наиболее активный миогенез отмечен нами в культурах печени на сроках эмбриогенеза, характеризующихся наибольшим относительным содержанием в ней КОЕ-Ф (16-17 суток).

Обработка МСК из печени 16-суточных зародышей на 4-м пассаже 10 мкМ 5азацитидином по протоколу, аналогичному примененному нами для клеток костного мозга, независимо от субстрата (пластик, фибронектин или ламинин) не вызывала появления признаков миогенеза. МСК из печени зародышей того же срока развития, обработанные на 1-м пассаже 10 мкМ 5-азацитидином в сочетании с 10 нг/мл bFGF, через 19 суток обнаруживали некоторые изменения (приобретали вытянутую форму, параллельную ориентацию, иногда интенсивную базофилию цитоплазмы), но миотуб не образовывали. Воздействие 3 мкМ 5азацитидина на клетки 5-го пассажа из печени 17-суточных зародышей, культивируемые на пластике в среде с 2% сыворотки, 10 нг/мл EGF, 10нг/мл PDGF, 1% ITS+1 и 50 мкг/мл 2-фосфо-L-аскорбата натрия, с последующим двухнедельным культивированием в той же среде без 5азацитидина также не привело к миогенезу, что было подтверждено отрицательным результатом иммуноцитохимического анализа на МуоD. Однако при использовании того же протокола с заменой пластикового субстрата на фибронектиновое покрытие и PDGF на bFGF клетки 1-го пассажа из печени 17-суточных зародышей в некоторых случаях (10 нг/мл) формировали на 8-е сутки культивирования немногочисленные миотубы, содержащие десмин и отличающиеся от спонтанно образующихся в первичной культуре морфологическими признаками большей зрелости - периферическим расположением ядер и поперечной исчерченностью (рисунок 34 а, б). К 10-м суткам культивирования миотубы начинали деградировать, фрагментироваться и открепляться от субстрата [Шевелева и др., 2011].

По имеющимся сведениям, мышечная дифференцировка может быть индуцирована не только 5-азацитидином, но и совокупностью факторов, выделяемых в среду миобластами. В частности, сообщалось о миогенезе в культуре MCK из костного мозга плодов человека [Chan et al., 2006], а также фибробластов кожи, мозга и скелетных мышц [Salvatori et al., 1995; Wise et al., 1996] под влиянием среды, кондиционированной линией миобластов мыши C2C12. Кондиционированная миобластами среда оказывалась эффективной и в тех случаях, когда обработка клеток 5-азацитидином не вызывала их дифференцировки [Chan et al., 2006].

В наших экспериментах было отмечено формирование единичных небольших миотуб в культуре МСК из печени 17-суточных зародышей при добавлении к ним на 1-м пассаже кондиционированной среды от клеток из скелетных мышц тех же зародышей. Миотубы впервые появлялись через 6 суток культивирования; по морфологии они не отличались от наблюдаемых в первичной культуре (рисунок 34 в, г). При сокультивировании МСК из печени с миобластами линии C2C12 миотубы не образовывались, но в единичных ядрах выявлялся МуоD (рисунок 34 д), что могло указывать на начальные стадии миогенной дифференцировки.

Таким образом, результаты наших экспериментов указывают на слабую выраженность миогенных потенций МСК. Более того, описанные выше (см. раздел 2.3.1) единичные случаи спонтанного образования миотуб в пассируемой культуре стромальных клеток из печени

160





Рисунок 34. Миогенез в культурах МСК из печени 17-суточных зародышей крысы (1-й пассаж): а, б – под действием 5-азацитидина в среде с EGF и bFGF, 11 суток индукции (а – окрашивание азур-эозином, б - непрямое иммунофлуоресцентное окрашивание на десмин с применением флуорохрома Alexa 568); в, г – в среде, кондиционированной клетками из мышц 17-суточных зародышей крысы, 6 суток индукции; миотубы показаны стрелками (в – прижизненная съемка, фазовый контраст, г – окрашивание азур-эозином); д – в совместной культуре с миобластами линии C2C12, 10 суток индукции (непрямое иммунофлуоресцентное окрашивание на МуоD с применением флуорохрома Alexa 568, указано стрелкой; д' - совмещение изображения результата иммуномечения и ядер, окрашенных Hoechst 33342).

зародышей не позволяют однозначно связывать миогенез, наблюдаемый в индукционной или кондиционированной миобластами среде, с дифференцировкой МСК. Возможно, источником обнаруженных нами в этих условиях единичных миотуб являются предсуществующие в зародышевой печени коммитированные предшественники, ответственные за спонтанный миогенез в первичной культуре и в некоторых случаях сохраняющиеся при пересеве.

5. Сравнительный анализ субпопуляций МСК, различающихся по чувствительности к 5-фторурацилу

5.1. Чувствительность КОЕ-Ф печени зародышей и костного мозга половозрелых крыс к цитотоксическому действию 5-фторурацила

Ввиду недостаточной изученности влияния 5-ФУ на МСК представляло интерес оценить чувствительность к нему КОЕ-Ф на разных стадиях онтогенеза. Для сравнительного анализа были избраны клетки зародышевой печени и зрелого костного мозга крысы, представляющие клоногенные МСК соответственно пре- и постнатального организма. Мы использовали два различных способа обработки клеток 5-ФУ – *in vitro* и *in vivo*. В обоих случаях 5-ФУ значительно снижал число колоний, образуемых клетками как костного мозга, так и печени 16-суточных зародышей (таблица 10).

Таблица 10. Влияние 5-фторурацила на эффективность клонирования КОЕ-Ф крысы и величину стромальных колоний

	Вариант		Число колоний на 1 x 10 ⁶ клеток	В том числе:			Средняя				
Действие 5-ФУ				ЩФ [.]	≤50% ЩФ+ клеток	>50% ЩФ+ клеток	площадь колонии, мм ²				
in vitro Ileachb 16-	стный мозг	опыт 1	контроль	$9{,}41 \pm 1{,}20$				$17,07 \pm 13,05$			
			5-ФУ	$0{,}95\pm0{,}13^*$				9,93 ± 3,95			
		T 2	контроль	3,89±0,41	50,44±3,67%	40,76±3,61%	8,80±3,60%				
	Ko	опь	5-ФУ	1,27±0,07***	39,16±2,38%*	51,87±2,48%*	8,97±1,31%				
	Печень 16- суточных зарольшей	ır 1	контроль	19,51 ± 1,66				$7,73\pm5,52$			
		OTTE	5-ФУ	$3,17 \pm 0,53*$				$5{,}92\pm2{,}90$			
		str 2	контроль	9,61±0,41	93,05±2,08%	6,75±2,08%	0,20±0,21%				
		3 I	3 I	п с	3 I	3 I	шо	5-ФУ	2,88±0,27***	71,55±6,65%*	28,24±6,65%**
in vivo	Костный мозг	03F	103F	ыт 1	контроль	21,43 ± 1,09				$16,\!07\pm8,\!88$	
		ШО	5-ФУ	$8,31 \pm 0,83*$				$15,\!21 \pm 10,\!59$			
		т 2	контроль	6,53±0,74	18,56±5,15%	66,36±3,75%	15,08±3,13%				
		OIIE	5-ФУ	0,66±0,46***	0,00±16,33%	23,51±22,62%	76,49±22,62 %				
	Печень 16- суточных зарольшей	контроль		10,45 ± 1,29				13,09 ± 7,66			
			5-ФУ	0,21 ± 0,20*				7,82 ± 2,37			

Примечание. Достоверность различий с контролем: * - p<0,05; ** - p<0,01; *** p<0,001.

Существенных различий в чувствительности КОЕ-Ф костного мозга и зародышевой печени к действию 5-ФУ *in vitro* не отмечалось – в костном мозге устойчивы к нему были около

10-32% КОЕ-Ф, в печени - около 16-30%. Однако при введении 5-ФУ *in vivo* КОЕ-Ф костного мозга демонстрировали более высокую устойчивость к нему по сравнению с клетками зародышевой печени - в костном мозге через сутки после инъекции сохранялось 10-38% КОЕ-Ф, в печени – лишь около 2%. При этом КОЕ-Ф, пережившие воздействие 5-ФУ (за исключением клеток костного мозга, обработанных им *in vivo*), формировали преимущественно мелкие рыхлые колонии, тогда как в контрольных культурах колонии были гетерогенны по размеру и плотности [Паюшина и др., 2006]. Следует отметить, что в опыте с обработкой КОЕ-Ф костного мозга 5-ФУ *in vitro* как в контроле, так и в опыте выявлялись единичные колонии, часть клеток в которых имели множественные включения жира, то есть в популяции, устойчивой к 5-ФУ, видимо, сохранялись клетки, способные к спонтанному адипогенезу.

Влияние 5-ФУ на размеры образующихся стромальных колоний было подтверждено морфометрическим анализом их площадей (см. таблица 10). Под действием 5-ФУ во всех случаях наблюдалась тенденция к снижению средней площади колоний, но значительная вариабельность в их размерах не позволила выявить достоверных различий с контролем. Однако характер распределения колоний по размерам (рисунок А.12) в устойчивых к 5-ФУ популяциях (кроме клеток костного мозга после введения 5-ФУ *in vivo*) отличался от контрольного – доля более крупных колоний и их максимальный размер были снижены.

Возможно, более крупные размеры колоний, образованных чувствительными к 5-ФУ клетками, являлись следствием активной пролиферации последних, тогда как медленно циклирующие КОЕ-Ф, образующие небольшие клоны, были менее подвержены его повреждающему действию. По данным ван Занта [van Zant, 1984], при действии 5-ФУ на клоногенные кроветворные клетки костного мозга (колониеобразующие единицы селезенки, КОЕ-С) выживают в первую очередь их ранние предшественники (пре-КОЕ-С), дающие колонии в селезенке облученного реципиента позднее «зрелых» КОЕ-С. Не исключено, что сходная ситуация имеет место и в стромальном диффероне – к 5-ФУ устойчивы более примитивные предшественники, которым для образования колонии требуется больше времени, чем более продвинутым в дифференцировке. Впрочем, следует заметить, что размер колоний зависит не только от числа клеток в них (а следовательно, от пролиферативной активности КОЕ-Ф), но и от величины клеток и плотности их расположения. Однако, как было отмечено выше, колонии, образовавшихся после воздействия 5-ФУ, обычно имели рыхлую структуру, т.е., вероятно, содержали всё же меньше клеток, чем достаточно компактные колонии, образованные контрольными клетками.

Оценка активности ЩФ показала, что воздействие 5-ФУ на КОЕ-Ф из обоих органов несколько повышало долю колоний, содержащих этот фермент, что может говорить о преимущественном выживании клоногенных клеток с остеогенными потенциями. Их

положение в стромальном диффероне не вполне ясно. Имеющиеся в литературе данные об субпопуляциях МСК активности ШΦ В различных костного мозга человека. свидетельствующие о меньшей скорости пролиферации клеток, содержащих этот фермент, более слабой экспрессии ими генов, связанных с клеточным циклом (циклин A, CDK2, CDK4) и плюрипотентностью (rex1, nanog), и ограниченной способности к адипо- и хондрогенезу, указывают на их более продвинутое положение в гистогенетическом ряду по сравнению с клетками, лишенными ЩФ [Kim et al., 2012 c]. Возможно, наряду с наиболее примитивными покоящимися МСК эта субпопуляция коммитированных к остеогенезу клеток из-за сниженной пролиферативной активности более резистентна к 5-ФУ, чем активно пролиферирующие мультипотентные МСК. В то же время нельзя исключить, что повышенное содержание клеток с положительной реакцией на ЩФ среди МСК, обработанных 5-ФУ, связано с избирательной элиминацией клеток, коммитированных к другим направлениям дифференцировки, утративших способность к остеогенезу и сопутствующую ей активность ЩФ.

5.2. Остеогенные и адипогенные потенции субпопуляций МСК, различающихся по чувствительности к 5-фторурацилу

С целью охарактеризовать дифференцировочный потенциал субпопуляций МСК, различающихся по чувствительности к 5-ФУ, и прояснить их гистогенетические взаимоотношения мы провели эксперименты по индукции остеогенной и адипогенной дифференцировки МСК из зрелого костного мозга и печени 16-суточных зародышей, подвергнутых воздействию 5-ФУ, либо контрольных клеток, не обработанных препаратом.

Подсчет жировых клеток, образовавшихся после 13 суток культивирования МСК костного мозга в адипогенной среде (рисунок А.13), выявил тенденцию к несколько меньшей выраженности потенций к адипогенезу у клеток, обработанных 5-ФУ *in vitro*, по сравнению с не обработанными им МСК (число адипоцитов составляло соответственно 442,73±56,36 и 582,73±53,64 клеток на 1 см²). В ходе пассирования клеток этих двух популяций различия в их способности к жировой дифференцировке исчезали: на 4-м пассаже клетки, пережившие воздействие 5-ФУ, через 16 суток индукции адипогенеза образовывали 550,00±50,91 адипоцитов на 1 см², а не обработанные им клетки – 530,45±59,55 адипоцитов на 1 см². При этом резистентные и чувствительные к 5-ФУ МСК демонстрировали значительные

различия в остеогенных потенциях. Обработанные им клетки, помещенные в остеогенную среду на 1-м пассаже, формировали через 19 суток достоверно (p<0,01) больше костных узелков, чем не обработанные (соответственно 7,21±0,62 и 4,54±0,62 узелков на 1 см²), эти узелки были крупнее и плотнее, а реакция на ЩФ в них, как правило, интенсивнее (рисунок 35

а, б). Анализ дифференцировки на 5-м пассаже показал, что остеогенные потенции у клеток обеих субпопуляций ослаблены по сравнению с таковыми на 1-м пассаже. После 21 суток индукции в культуре как обработанных, так и не обработанных 5-ФУ клеток практически отсутствовали типичные костные узелки; признаки остеогенеза проявлялись лишь в усилении реакции на ЩФ и сосредоточении ее в более или менее компактных скоплениях фибробластоподобных или полигональных клеток (в противоположность слабому равномерному окрашиванию практически всего монослоя в отсутствие индукторов остеогенеза). Сравнение выраженности остеогенеза в популяциях МСК, различающихся по чувствительности к 5-ФУ, обнаружило при этом картину, обратную наблюдаемой на 1-м пассаже: в культуре, содержащей чувствительные к цитотоксическому препарату клетки, реакция на ЩФ была интенсивнее, а границы окрашенных на этот фермент участков монослоя отчетливее, чем в культуре клеток, устойчивых к 5-ФУ (рисунок 35 в, г), что указывает на более быструю потерю последними остеогенных потенций при пассировании. Следует отметить, что клетки, обработанные 5-ФУ, на первых двух пассажах пролиферировали несколько быстрее контрольных, однако после 6 пассажей их рост прекратился, а контрольная популяция, замедлив пролиферацию на 4-5-м пассаже, впоследствии возобновила активный рост и была успешно пересеяна на 7-й пассаж.

Сходные данные были получены при анализе дифференцировки МСК костного мозга, обработанных 5-ФУ *in vivo*. Устойчивые к 5-ФУ клетки несколько уступали чувствительным к нему по активности адипогенеза на 1-м пассаже. После 7 суток инкубации в адипогенной среде МСК контрольных крыс, в отличие от подвергнутых действию 5-ФУ, образовывали множество жировых клеток, однако к 11 суткам индукции адипогенеза большинство из них откреплялись, и различия между популяциями нивелировались: число адипоцитов на 1 см² составляло 2194,09±196,36 в контрольной культуре и 1987,73±143,18 в культуре клеток, устойчивых к 5-ФУ. В остеогенной среде клетки 1-го пассажа от животных, получивших препарат, через 15 суток формировали многочисленные, часто достаточно крупные костные узелки с интенсивной реакцией на ЩФ, как правило, минерализованные (рисунок 35 д). В культуре от контрольных крыс к этому сроку лишь изредка встречались мелкие скопления остеобластоподобных клеток, окрашенные на ЩФ (обычно слабее, чем после воздействия 5-ФУ), но не содержащие солей Ca^{2+} (рисунок 35 е). Быстрое прекращение роста МСК от животных, обработанных 5-ФУ, в ходе пассирования не позволило проанализировать длительность сохранения ими потенций к дифференцировке. К 3-му пассажу в культуре сохранялись лишь единичные клетки сильно распластанной формы, характерной для стареющих МСК. Контрольные клетки при этом продолжали пролиферировать и не проявляли явных морфологических признаков старения.



Рисунок 35. Остеогенная дифференцировка МСК костного мозга крысы, обработанных 5-ФУ (а, в, д), в сравнении с не обработанными им клетками (б, г, е): а, б - обработка 5-ФУ in vitro, 19 суток индукции остеогенеза на 1-м пассаже; в, г – обработка 5-ФУ in vitro, 21 сутки индукции остеогенеза на 5-м пассаже; д, е - обработка 5-ФУ in vivo, 15 суток индукции остеогенеза на 1-м пассаже; д, е - обработка 5-ФУ in vivo, 15 суток индукции остеогенеза на ЩФ (а - г), окрашивание ализариновым красным S (д, е), ядра докрашены гематоксилином. Увел.: об. х4, ок.х10.

Таким образом, независимо от способа обработки клеток 5-ФУ резистентная к нему субпопуляция МСК костного мозга на 1-м пассаже демонстрировала повышенные остеогенные потенции, что согласуется с литературными данными [Wang et al., 2006]. Наряду с другими особенностями этой субпопуляции - меньшей, чем у контрольных клеток, способностью к адипогенезу и пролиферации и более быстрой потерей остеогенных потенций - это подтверждает гипотезу о том, что обработка 5-ФУ, удаляя активно пролиферирующие мультипотентные МСК, обогащает популяцию коммитированными остеогенными клетками. Однако не исключено и отмеченное другими авторами присутствие в субпопуляции,

166

устойчивой к 5-ФУ, наиболее ранних членов стромального дифферона, находящихся в покое и являющихся предшественниками чувствительных к 5-ФУ клеток [Minguell et al., 2000].

Анализ потенций МСК из зародышевой печени, обработанных 5-ФУ *in vitro*, выявил несколько иную картину. Кинетика роста устойчивой к нему субпопуляции МСК в целом была сходна с таковой для соответствующих клеток из костного мозга, хотя способность к пролиферации сохранялась дольше. В начальные сроки культивирования клетки, обработанные 5-ФУ, росли быстрее не обработанных; на 5-6-м пассаже было отмечено существенное замедление роста обеих популяций; начиная с 9-го пассажа контрольные клетки постепенно ускорили рост, в то время как обработанные 5-ФУ пролиферировали значительно менее активно и имели распластанную форму. К 14-му пассажу их пролиферативный потенциал, очевидно, был близок к исчерпанию, тогда как клетки, не обработанные 5-ФУ, практически восстановили скорость роста и морфологию, свойственные им в начале культивирования.

Соотношение адипогенных потенций МСК, различающихся по чувствительности к 5-ФУ, варьировало от опыта к опыту: в одном из них обработанные препаратом клетки на 1-м пассаже образовывали в индукционной среде больше адипоцитов, чем не обработанные, а в другом, напротив, меньше (таблица 11). Жировые клетки во всех случаях располагались рыхлыми скоплениями и часто имели морфологию зрелых адипоцитов (рисунок А.14). В ходе пассирования обе субпопуляции МСК в значительной степени теряли способность к адипогенезу. На 5-м пассаже в культуре клеток, как обработанных, так и не обработанных 5-ФУ, присутствовали лишь немногочисленные клетки с жировыми включениями, обычно сохраняющие морфологию фибробластов, или скопления из 3-10 таких клеток. Достоверных различий в их числе между чувствительными и устойчивыми к 5-ФУ клетками не отмечалось (см. таблица 11).

Опит	Вариант	Число адипоцитов на 1 см ²		
Опыт	Бариант	На 1-м пассаже	На 5-м пассаже	
1	Контроль	1136,36±115,55	51,52±17,50	
	5-ФУ	1960,00±128,23	86,36±28,18	
2	Контроль	2119,09±165,00	324,55±30,91	
	5-ФУ	1435,45±120,00	351,36±70,00	

Таблица 11. Адипогенная дифференцировка субпопуляций МСК из печени 16-суточных зародышей, различающихся по чувствительности к 5-ФУ in vitro

При индукции остеогенеза на 1-м пассаже обе субпопуляции МСК зародышевой печени формировали плотные очаги фибробластоподобных клеток с усиленной по сравнению с контролем без индукторов реакцией на ЩФ; при этом потенции клеток, обработанных 5-ФУ,

были сопоставимы с таковыми контрольных клеток либо выражены несколько сильнее, что проявлялось в большей величине и плотности очагов дифференцировки (рисунок 36 а, б). Что же касается изменения остеогенных потенций по мере пассирования, то в популяции, устойчивой к 5-ФУ, они снижались в меньшей степени и позднее, чем у контрольных МСК. В культуре клеток, не обработанных 5-ФУ, на 5-м пассаже наблюдались значительное уменьшение размера и плотности очагов остеогенеза и ослабление реакции на ЩФ (рисунок 36 г), а на 11-м признаки остеогенеза отсутствовали (лишь в единичных фибробластах отмечалась слабая реакция на ЩФ, интенсивность которой была не выше, чем в среде без индукторов) (рисунок 36 е). В то же время при индукции костной дифференцировки устойчивых к 5-ФУ МСК на 5-м пассаже число Щ Φ^+ клеток, плотность их расположения и интенсивность реакции в этой популяции были приблизительно такими же, как на 1-м пассаже (рисунок 36 в) либо сниженными, но в меньшей степени по сравнению с клетками, не обработанными 5-ФУ; на 11-



Рисунок 36. Остеогенная дифференцировка МСК печени 16-суточных зародышей крысы, обработанных 5-ФУ in vitro (a, в, д), в сравнении с не обработанными им клетками (б, г, е): a, б – 1-й пассаж; в, г – 5-й пассаж; д, е -11-й пассаж. 14 суток индукции остеогенеза. Реакция на ЩФ, ядра докрашены гематоксилином. Увел.: об. х4, ок.х10.

м пассаже очаги остеогенеза еще формировались, однако их размер становился меньше, а реакция на ЩФ слабее (рисунок 36 д).

Таким образом, резистентная к 5-ФУ субпопуляция МСК из печени зародыша уступала чувствительной к нему по продолжительности активного роста, как и в случае МСК из костного мозга, то есть, видимо, содержала более зрелые клетки. Однако, в противоположность клеткам костного мозга, остеогенные потенции устойчивых к 5-ФУ МСК зародышевой печени дольше сохранялись при пассировании, что не согласуется с гипотезой о преобладании в этой субпопуляции наиболее зрелых остеогенных предшественников. Возможно, различия в свойствах фракций МСК, выживающих при воздействии 5-ФУ на клетки зрелого костного мозга и печени зародыша, отражают особенности структуры популяций стромальных клеток, обусловленные спецификой функций этих органов – в частности, разное содержание клеток, коммитированных к остеогенезу. Уточнение положения устойчивых к 5-ФУ субпопуляций в гистогенетическом ряду МСК требует дальнейших исследований.

6. Влияние компонентов внеклеточного матрикса на клональный рост и дифференцировку МСК

6.1. Клональный рост МСК на компонентах внеклеточного матрикса

6.1.1. Содержание КОЕ-Ф в популяциях клеток костного мозга и зародышевой печени, различающихся по скорости прикрепления к фибронектину, коллагену I типа и ламинину

Мы исследовали динамику адгезии КОЕ-Ф зрелого костного мозга и печени 16-суточных зародышей крысы к белкам внеклеточного матрикса в сравнении с пластиком. Для этого эффективность клонирования клеток, прикрепившихся к каждому субстрату за первые 7 суток, сопоставили с таковой для клеток, оставшихся в течение этого срока во взвеси и прикрепившихся в последующие 7 суток, после переноса в новые флаконы с тем же покрытием. Для оценки остеогенных потенций КОЕ-Ф, прикрепившихся в разные сроки, в колониях была проанализирована активность ЩФ. Результаты представлены в таблицах Б.1 и Б.2.

Как показал подсчет колоний, значительная (часто преобладающая) доля КОЕ-Ф костного мозга после первой недели культивирования на пластике оставались в суспензии, сохраняя при этом клоногенную способность. Большинство клоногенных клеток из печени плодов прикреплялись к пластику в первые 7 суток, но и в этой культуре также присутствовала популяция КОЕ-Ф, прикрепляющихся и вступающих в клональный рост только после переноса в новые флаконы через 7 суток от начала культивирования. Подобные клетки, длительное

время сохраняющиеся во взвеси и реализующие свою клоногенную способность только после переноса в другой флакон, были обнаружены в популяциях МСК костного мозга и зародышевой печени и в предыдущих экспериментах [Буеверова и др., 2008]; о существовании фракции МСК, проявляющих адгезивные свойства в поздние сроки культивирования, сообщают и другие авторы [Wan et al., 2006]. Возможно, они представляют собой наименее зрелую субпопуляцию МСК, созревание которой до стадии КОЕ-Ф требует длительного пребывания в суспензии. Нельзя исключить и возможность открепления прикрепившихся к субстрату клеток с сохранением их жизнеспособности и клоногенных свойств, хотя это предположение требует экспериментальной проверки.

Покрытие флаконов белками внеклеточного матрикса не приводило к значительному повышению числа КОЕ-Ф как костномозгового, так и печеночного происхождения, прикрепившихся в первую неделю культивирования. Аналогичные данные были получены при исследовании адгезивных свойств КОЕ-Ф из костного мозга мыши другими авторами, не обнаружившими более эффективного колониеобразования на фибронектине, коллагене I типа или ламинине по сравнению с пластиком [Phinney et al., 1999 a; Chen et al., 2007]. Однако проведенный нами анализ популяции КОЕ-Ф, прикрепляющихся в более поздний срок, выявил различия в динамике адгезии МСК к изучаемым субстратам. Присутствие на поверхности флаконов фибронектина или коллагена I типа, как правило, повышало долю КОЕ-Ф из костного мозга, прикрепившихся в первые 7 суток, и приводило к адгезии в течение этого срока подавляющего большинства КОЕ-Ф из зародышевой печени. Это может говорить о более быстром прикреплении КОЕ-Ф к данным белкам, возможно, в связи с высокой специфичностью взаимодействия последних с мембранными рецепторами. Если предположить возможность открепления клоногенных клеток с поверхности, то различия в их содержании во взвеси могут объясняться также более прочной адгезией клеток к белкам матрикса, чем к пластику, что было показано, в частности, для фибронектина [Athanassiou, Deligianni, 2001].

Влияние ламинина на динамику прикрепления КОЕ-Ф было выражено слабее. Как известно, этот белок представлен несколькими изоформами, по-разному влияющими на прикрепление клеток. Показано, в частности, что пассируемые МСК костного мозга человека способны к адгезивным вазимодействиям с ламинином-5 и в меньшей степени с ламинином 10/11, тогда как изоформы ламинина 1 и 2/4 практически не обеспечивает их адгезии [Salasznyk et al., 2004; Klees et al., 2005; Hashimoto et al., 2006]. В наших экспериментах были использованы флаконы BioCoat, покрытые в производственных условиях ламинином из саркомы мыши, представляющим собой смесь изоформ этого белка, возможно, оказывающих неодинаковое влияние на клетки. Авторы экспериментов по культивированию КОЕ-Ф костного мозга мыши на подобном ламининовом покрытии отмечали как более низкую эффективность

клонирования, так и меньшее общее число клеток по сравнению с пластиком [Phinney et al., 1999 a], что может говорить о слабой способности этого субстрата обеспечивать не только адгезию, но и пролиферацию клоногенных МСК.

В целом, судя по соотношению числа КОЕ-Ф, прикрепившихся и не прикрепившихся за первые 7 суток, клоногенные МСК из зародышевой печени были более адгезивны ко всем изученным субстратам, чем МСК зрелого костного мозга. Возможно, это объясняется важной морфогенетической ролью адгезивных взаимодействий клеток с матриксом в ходе эмбриогенеза. Так, ламинин участвует в развитии скелетной мускулатуры [Burkin, Kaufman, 1999] и, как предполагается, важен для формирования печеночных долек [Amenta, Harrison, 1997], а инактивация гена фибронектина у зародышей мыши ведет к летальным нарушениям в развитии нервной трубки и производных мезодермы [George et al., 1993]. Не исключено, что на пренатальных стадиях развития МСК, как и другие клетки, имеют больше рецепторов адгезии, чем у половозрелого животного. В пользу этого предположения свидетельствуют данные об экспрессии гена цепи интегрина α 4 (обеспечивающей адгезию в том числе к фибронектину) в МСК зародышевой печени, но не зрелого костного мозга человека [Götherström et al., 2005].

При сравнении культур КОЕ-Ф из обоих органов на пластике и белках внеклеточного матрикса не было выявлено явной зависимости размера и плотности колоний или морфологии клеток от субстрата, ни от срока адгезии. Оценка активности ЩФ показала, что среди КОЕ-Ф костного мозга, растущих на коллагене I типа или ламинине, доля остеогенных клеток сопоставима с таковой на пластике. Сходный результат был получен и авторами, оценивавшими влияние белков матрикса на активность ЩФ в колониях, образуемых КОЕ-Ф костного мозга мыши [Phinney et al., 1999 a]. Однако в наших экспериментах, в противоположность данным этих авторов, на фибронектине доля неокрашенных или слабоокрашенных на ЩФ колоний в популяции КОЕ-Ф, прикрепляющихся в первые 7 суток, была достоверно выше, чем на пластике. Это могло свидетельствовать о преимущественном прикреплении к этому белку клеток с низкими остеогенными потенциями либо о подавлении им остеогенеза. Тенденция к снижению относительного содержания КОЕ-Ф с остеогенными потенциями на фибронектине отмечена и при анализе менее адгезивных клеток, прикрепившихся в последующие 7 суток (см. таблица Б.1). При этом в колониях, образуемых как рано, так и поздно прикрепляющимися КОЕ-Ф, реакция на ЩФ обычно была менее интенсивна при культивировании на фибронектине по сравнению с пластиком (рисунок А.15). Доля остеогенных клеток среди КОЕ-Ф из печени зародышей была низкой независимо от субстрата.

Таким образом, судя по активности ЩФ, стромальные клетки костного мозга, прикрепляющиеся к фибронектину, отличаются от культивируемых на других субстратах

171

пониженными остеогенными потенциями. КОЕ-Ф из зародышевой печени характеризуются слабой способностью к остеогенной диференцировке, на которую иследуемые белки не влияют.

6.1.2. Эффективность клонирования МСК костного мозга при культивировании на фрагментах фибронектина

Выраженное влияние фибронектина на адгезию КОЕ-Ф и активность ЩФ в образуемых ими колониях побудило нас к углубленному исследованию взаимодействия клоногенных МСК с этим белком, а именно к попыткам идентификации конкретного участка его молекулы, ответственного за обнаруженные эффекты. Молекула фибронектина содержит несколько структурно-функциональных доменов, основными из которых являются коллагенсвязывающий, связывающийся с клеткой и С-концевой гепаринсвязывающий [Yamada et al., 1986]. Вопрос о роли различных доменов этого белка в его влиянии на те или иные клеточные процессы остается во многом неизученным. Перспективным подходом к исследованию данного вопроса фрагменты, является протеолитическое расщепление фибронектина на содержащие индивидуальные домены, с оценкой их биологической активности. В частности, это позволило установить, что домен, связывающийся с клеткой, играет главную роль в прикреплении клеток различных типов к фибронектину [Woods et al., 1986; Dalton et al., 1995; Kim et al., 2003], коллагенсвязывающий может участвовать в контроле их адгезии, миграции и дифференцировки [Lesot et al., 1992; Schor et al., 1996; Akimov et al., 2000; Priglinger et al., 2004], а полноценное распластывание клеток с образованием фокальных контактов и стресс-фибрилл требует дополнительного сигнала от присутствующего в среде гепаринсвязывающего домена [Woods et al., 1986; Jeong et al., 2001; Kim et al., 2001; Peterson et al., 2005]. Однако, по некоторым данным, клетки различных типов могут различаться по механизму взаимодействия с фибронектином, что проявляется в их неодинаковом ответе на одни и те же его фрагменты [Dalton et al., 1995].

Для выяснения вклада функциональных доменов фибронектина в его влияние на адгезию и клональный рост МСК мы сравнили образование колоний клетками костного мозга, прикрепившимися за первые 7 суток к фрагментам фибронектина из плазмы человека с молекулярной массой 120 кДа, 40 кДа и 60 кДа, содержащим соответственно связывающийся с клеткой, С-концевой гепаринсвязывающий и коллагенсвязывающий домены, а также к интактному фибронектину и контрольным флаконам (непокрытым пластиковым либо БСА покрытым лля предотвращения адсорбции фибронектина ИЗ сыворотки). Преимущественной адгезии КОЕ-Ф к какому-либо фрагменту обнаружено не было: на каждом из них, а также при сочетании 120 кДа на поверхности флакона с 40 кДа в среде, число колоний было, как правило, сопоставимым (таблица 12).

N⁰		Число	Доля колоний, содержащих ЩФ+ клетки, %			
опыта	Субстрат	КОЕ-Ф на 1	Неокрашенные	≤50% ЩФ+	>50% ЩФ+	
		млн клеток		клеток	клеток	
1	Пластик	$0,72\pm0,25$	29,17±14,05%	70,83±14,05%	23,75±14,05%	
	Фн	3,08±0,35***	75,00±6,81%**	25,00±6,81%**	12,78±4,67%	
	120 кДа	$2,44\pm0,42^{***}$	67,17±5,56%*	32,83±5,56%*	17,78±5,70%	
	40 кДа	$1,38{\pm}0,18^*$	28,83±7,59%	71,17±7,59%	23,03±4,55%	
	120 кДа+40 кДа	2,83±0,32***	69,54±3,36%**	30,46±3,36%**	18,20±3,18%	
2	Пластик	$7,78{\pm}1,69$	13,29±5,20%	27,13±4,02%	59,58±3,45%	
	Фн	2,93±0,62**	47,46±8,36%***	21,32±6,79%	31,32±5,59%***	
	60 кДа	6,25±1,21	17,84±5,07%	30,08±5,53%	52,08±6,37%	
	120 кДа	7,50±0,91	36,78±3,48%***	26,45±4,37%	36,77±5,60%***	
	40 кДа	6,83±1,29	22,88±1,99%	25,33±3,55%	51,79±3,26%	
	120 кДа +40 кДа	$7,78\pm2,20$	44,70±4,66%***	24,64±4,12%	30,66±3,99%***	
3	БСА	3,83±0,38	45,83±7,85%	41,55±6,16%	12,62±3,59%	
	Фн	2,50±0,51*	54,84±14,28%	38,32±11,95%	6,83±3,31%	
	60 кДа	3,70±0,24	43,22±3,18%	40,86±3,73%	15,92±2,06%	
	120 кДа	3,20±0,40	78,54±2,28%***	19,09±3,26%**	2,37±0,98%**	
	40 кДа	2,68±0,65	48,46±4,84%	34,41±3,83%	17,13±2,63%	
	120 кДа+40 кДа	2,35±0,48*	71,83±9,90%*	24,48±7,13%	3,69±2,77%*	

Таблица 12. Адгезия КОЕ-Ф костного мозга крысы к фибронектину и его фрагментам. Экспрессия щелочной фосфатазы клетками образующихся колоний

Примечание. $\Phi h - \phi u \delta p o hermuh. Достоверность различий между контролем (пластик или БСА) и опытом (фибронектин или его домен): * - <math>p < 0,05$; ** - p < 0,01; *** - p < 0,001.

Таким образом, наши эксперименты не выявили домена, играющего определяющую роль в адгезии МСК к фибронектину. Как известно, прикрепление фибробластов к этому белку опосредовано в первую очередь доменом, связывающимся с клеткой [Woods et al., 1986; Jeong et al., 2001]. В частности, для КОЕ-Ф костного мозга показано взаимодействие с фибронектином через рецептор этого домена – интегрин α 5 β 1 [Gronthos et al., 2001 b]. Однако в адгезии клеток к фибронектину может участвовать и его коллагенсвязывающий домен, обеспечивающий прикрепление и распластывание МСК [Song et al., 2007] и других типов клеток [Akimov et al., 2000; Priglinger et al., 2004] через тканевую трансглутаминазу на их поверхности. Мы не нашли в литературе данных об адгезии МСК к гепаринсвязывающему домену фибронектина, но сообщалось о прикреплении к нему эмбриональных фибробластов [Woods et al., 1986] и остеобластов [Dalton et al., 1995]. В качестве рецепторов к этому домену рассматриваются трансмембранные протеогликаны, прежде всего синдеканы [Woods et al., 1986; Jeong et al., 2001], и интегрин α4β1 [Peterson et al., 2005]. Присутствие данных молекул на поверхности MCK [Gronthos et al., 2001 b; Djouad et al., 2007] позволяет предполагать возможное участие гепаринсвязывающего домена во взаимодействии фибронектина с этими клетками. Не исключено, что образование колоний на исследуемых нами фрагментах фибронектина связано с прикреплением КОЕ-Ф к субстрату через вышеупомянутые рецепторы, однако для окончательных выводов требуется более детальное изучение механизма адгезии.

Анализ активности ЩФ показал, что на фрагменте фибронектина 120 кДа (как в присутствии 40 кДа, так и без него) доля содержащих этот фермент колоний была ниже, чем в контроле, тогда как фрагменты 40 и 60 кДа на нее не влияли (см. таблица 12).

Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что в снижении остеогенных потенций КОЕ-Ф из костного мозга при их культивировании на фибронектине главную роль играет его домен, связывающийся с клеткой. Этот вывод подтверждается результатами экспериментов по индукции костной дифференцировки МСК, описанными ниже (раздел 6.2.2).

6.2. Влияние адгезии к белкам внеклеточного матрикса на остеогенную дифференцировку МСК костного мозга

Влияние взаимодействий с компонентами внеклеточного матрикса на остеогенез оценивали на культуре МСК из костного мозга половозрелой крысы в связи с наибольшими остеогенными потенциями этих клеток по сравнению с МСК из других изучаемых источников. Клетки культивировали 14 суток в стандартной остеогенной среде на платах, покрытых тем или иным матриксным белком. О выраженности дифференцировки судили по величине участков минерализации, визуализируемых путем окрашивания ализариновым красным S.

6.2.1. Остеогенная дифференцировка МСК при культивировании на фибронектине, коллагене I типа и ламинине

Анализ терминальной остеогенной дифференцировки МСК костного мозга в индукционной среде подтвердил наше предварительное заключение о влиянии адгезии к фибронектину, коллагену и ламинину на их остеогенные потенции, сделанное на основании оценки спонтанной экспрессии ЩФ в первичной культуре. В присутствии индукторов остеогенеза клетки, культивируемые на этих белках, формировали очаги остеогенеза, подобные образуемым ими в индукционной среде на пластике и представляющие собой плотные скопления остеобластоподобных клеток. В большинстве очагов имелись более или менее выраженные отложения солей Ca^{2+} ; судя по их площади, использование в качестве субстрата

коллагена I типа или ламинина не оказывало воспроизводимого достоверного влияния на минерализацию костного матрикса по сравнению с культурами на пластике (рисунок 37).

Таким образом, в противоположность имеющимся в литературе сообщениям об усилении остеогенной дифференцировки МСК костного мозга человека при их культивировании на этих белках [Salaznyk et al., 2004; Klees et al., 2005], мы не наблюдали подобного эффекта. Впрочем, ряд других авторов также не обнаруживают влияния коллагена I типа [Hori et al., 2004; Sogo et al., 2007] и ламинина [Hashimoto et al., 2006] на дифференцировку МСК из костного мозга человека или крысы в остеогенной среде. Вероятно, расхождения в результатах исследований связаны с различиями в источниках клеток, а также в используемых препаратах матриксных белков и способах их нанесения на поверхность культуральной посуды.



Рисунок 37. Площадь отложений Ca²⁺ в очагах остеогенной дифференцировки МСК костного мозга крысы на различных субстратах (в процентах от общей площади поверхности лунки). Достоверность различий между пластиком и белками матрикса: *** - p<0,001.

На фибронектине в индукционной среде также формировались многочисленные очаги дифференцировки, состоящие из типичных остеобластоподобных клеток, но лишь немногие из них содержали соли Ca²⁺, причем, как правило, в небольшом количестве. Площадь минерализованных областей была значительно меньше, чем на пластике (см. рисунок 37). Подобный результат может свидетельствовать о том, что культивирование МСК на фибронектине приводило либо к замедлению темпа дифференцировки, либо к блокированию ее завершающих стадий. Однако последнее предположение не согласуется с данными о необходимости взаимодействия остеобластов с фибронектином образования для минерализованных узелков [Moursi et al., 1996]. Можно допустить, что сниженные остеогенные потенции клеток, культивируемых на фибронектине, связаны с прикреплением к нему менее зрелых предшественников, еще не коммитированных к остеогенезу и требующих большего времени для его завершения. Однако имеющиеся данные об усилении экспрессии цепей

интегринов α5 и β1, являющихся компонентами рецептора фибронектина, на начальных стадиях костной дифференцировки MCK [Martino et al., 2009] противоречат предположению о сниженной адгезивности к нему коммитированных остеогенных клеток.

Полученные нами данные о подавлении остеогенеза под действием фибронектина не находят подтверждения в литературе. Напротив, имеются сообщения о стимулирующем влиянии этого белка на остеогенные потенции МСК, однако оно, по-видимому, ограничивается ранними стадиями дифференцировки. В частности, при индукции остеогенеза *in vitro* на гидроксиапатитной керамике показано повышение активности ЩФ при покрытии носителя фибронектином [Sogo et al., 2007], а в монослойной культуре на фибронектине отмечена усиленная экспрессия гена Runx2, являющегося маркером коммитирования к остеогенезу, при сопоставимой с контролем на пластике активности ЩФ [Cool, Nurcombe, 2005]. Однако мы не можем непосредственно сопоставлять наши результаты с данными этих работ ввиду несоответствия исследуемых стадий дифференцировки. Впрочем, в аналогичном исследовании, проведенном на МСК из костного мозга человека, не было выявлено различий в количестве откладываемого Ca²⁺ при индукции остеогенеза на пластике и фибронектине [Salasznyk et al., 2004]. Причины этого расхождения в результатах не вполне ясны; не исключено, что оно обусловлено неодинаковой видовой принадлежностью использованных клеток.

6.2.2. Остеогенная дифференцировка МСК на фрагментах фибронектина

С целью поиска участка молекулы фибронектина, опосредующего его ингибирующее влияние на остеогенез, мы индуцировали остеогенную дифференцировку МСК костного мозга на фрагментах фибронектина, содержащих индивидуальные домены – связывающийся с клеткой (фрагмент 120 кДа), коллагенсвязывающий (60 кДа) и гепаринсвязывающий (40 кДа). Как показали проведенные после 14 суток индукции морфологический анализ (рисунок 38) и измерение площади кальцифицированных областей (таблица 13), на фрагменте 120 кДа костные узелки были минерализованы слабее, чем на пластике, хотя степень подавления остеогенеза этим фрагментом была меньшей по сравнению с интактным фибронектином. При сочетании фрагментов 120 кДа на поверхности культуральной посуды и 40 кДа в среде ингибирующий эффект был выражен еще сильнее: скопления остеобластов встречались реже и были мельче, чем без добавления фрагмента 40 кДа, а минерализация практически отсутствовала. В то же время один фрагмент 40 кДа также не влиял на ее выраженность.

Ранее, при анализе влияния фибронектина и его фрагментов на спонтанную экспрессию ЩФ в первичной культуре МСК костного мозга, нами также была выявлена определяющая

роль фрагмента 120 кДа в ослаблении активности этого фермента (см. раздел 6.1.2). Как известно, костный матрикс минерализуется при участии ЩФ, так что, возможно, между снижением ее экспрессии и более слабой минерализацией очагов остеогенеза в индукционной среде на фибронектине и его 120 kDa фрагменте существует непосредственная связь. Полученные результаты указывают на то, что в обеих ситуациях ингибирующее действие фибронектина на костную дифференцировку опосредовано в первую очередь взаимодействием интегринов на поверхности МСК с доменом фибронектина, связывающимся с клеткой. О роли

интегринов в регуляции остеогенеза неоднократно сообщалось [Gronthos et al., 2001 b; Docheva et al., 2007; Martino et al., 2009], однако выяснение конкретных механизмов передачи сигнала требует дополнительных экспериментов. Эффект связывания с фибронектином через интегрины может усиливаться дополнительным взаимодействием с ним через рецепторы к гепаринсвязывающему домену, как это было показано для адгезии и распластывания клеток на фибронектине [Woods et al., 1986; Jeong et al., 2001; Peterson et al., 2005]. В то же время коллагенсвязывающий домен, видимо, не участвует во влиянии фибронектина на остеогенез.

Следует отметить, что проблема влияния фибронектина и других белков на костную



Рисунок 38. Дифференцировка МСК костного мозга крысы в остеогенной среде на пластике (a, d), фибронектине (б, е), его фрагменте 120 кДа (в, ж) и при сочетании фрагментов 120 кДа на поверхности и 40 кДа в среде (г, з). а – г – общий вид культур (правые нижние лунки – контроль без индукторов остеогенеза); д – з - очаги остеогенеза (увел.: об. 10х, ок. 10х). Окрашивание ализариновым красным S и гематоксилином.

№ опыта	Субстрат	Площадь отложений Ca ²⁺ , %		
	Пластик	$1,77 \pm 0,28\%$		
	Фибронектин	$0,14 \pm 0,01\%$ ***		
1	120 кДа	$0,74 \pm 0,15\%^{**}$		
	40 кДа	$2.40 \pm 0.36\%$		
	120 кДа + 40 кДа	$0.06\pm0.01\%^{***}$		
2	Пластик	$1.88\pm0.21\%$		
	Фибронектин	$0.75 \pm 0.09\%^{***}$		
	60 кДа	$1.79 \pm 0.45\%$		

Таблица 13. Остеогенная дифференцировка МСК костного мозга на фибронектине и его фрагментах в сравнении с культуральным пластиком

Примечание. Площадь кальцифицированных областей выражена в процентах от общей площади поверхности лунки. Достоверность различий между контролем (пластик) и опытом (фибронектин или его домен): ** - p<0,01; *** - p<0,001.

дифференцировку МСК имеет не только теоретическое, но и прикладное значение. Иммобилизация адгезивных белков на носителях, применяемых для создания тканеинженерных конструкций, рассматривается как перспективный способ улучшения их заселения клетками. При этом белок, используемый для покрытия носителя, должен не только обеспечивать адгезию и пролиферацию клеток, но и не препятствовать их дифференцировке. Обнаруженное нами подавление остеогенеза на фибронектине поднимает вопрос о применимости этого белка в указанных целях. Впрочем, ответ клеток на внешние сигналы, в том числе на взаимодействие с внеклеточным матриксом, существенно зависит от пространственной организации и может различаться в монослойной культуре и в объеме носителя. Известно, в частности, что в двумерном и трехмерном окружении у клеток неодинаков уровень экспрессии интегринов и различным образом организованы фокальные контакты [Docheva et al., 2007]. Есть данные, что в трехмерном окружении как *in vitro* [Sogo et al., 2007], так и *in vivo* [Dennis et al., 1992] фибронектин не только не подавляет, но и усиливает остеогенную дифференцировку МСК. Анализ зависимости его влияния на МСК от их пространственного окружения представляется перспективной темой для дальнейших исследований.

6.3. Адипогенная дифференцировка МСК при культивировании на фибронектине, коллагене I типа и ламинине

Мы провели сравнительный анализ жировой дифференцировки МСК зрелого костного мозга в стандартной адипогенной среде на пластике, фибронектине, коллагене I типа и ламинине. После 12-15 суток инкубации на всех субстратах присутствовали многочисленные адипоциты, расположенные поодиночке или рыхлыми скоплениями без четких границ, реже –

плотными очагами, содержащими 5-50 клеток. В культурах, растущих на коллагене, жировых клеток было достоверно меньше, чем на пластике; тот же эффект, хотя и в меньшей степени, отмечался на фибронектине (рисунок 39). Ламинин не влиял на число образующихся адипоцитов, однако на этом субстрате чаще, чем на других, присутствовали компактные скопления жировых клеток, а сами клетки несколько чаще бывали более крупными и зрелыми (рисунок А.16).

Имеющиеся в литературе сведения о влиянии компонентов внеклеточного матрикса на жировую дифференцировку неоднозначны. Некоторые авторы отмечают ослабление адипогенных потенций MCK при адгезии к фибронектину [O'Connor et al., 2003; Luo et al.,



2008], тогда как в других работах обнаружено усиление адипогенеза на фибронектине [Angstmann et al., 2011] или отсутствие его влияния на выраженность дифференцировки [Hausman et al., 1996]. Показана стимуляция адипогенеза ламинином в условиях *in vitro* [Hausman et al.,

Рисунок 39. Число адипоцитов в культуре МСК костного мозга крысы, инкубируемых в адипогенной среде на различных субстратах. Достоверность различий между пластиком и белками матрикса: * - p<0,05; ** - p<0,01. 1996] и *in vivo* [Cronin et al., 2007]. Есть сообщения об отсутствии влияния коллагена I типа на число адипоцитов, образуемых стромальными клетками жировой ткани в индукционной среде

[Hausman et al., 1996; O'Connor et al., 2003]. В то же время эффективность жировой дифференцировки МСК костного мозга на коллагеновом матриксе, по некоторым данным, зависит от структурной конформации последнего: на денатурированном коллагене I типа адипогенез эффективен, на нативном – нет [Mauney, Volloch, 2009].

Авторы, отмечающие подавление адипогенеза под действием фибронектина, связывают его с усиленным распластыванием клеток на этом субстрате и соответствующей перестройкой актинового цитоскелета [Spiegelman, Ginty, 1983; Luo et al., 2008]. Известно, что распластывание клеток с формированием фокальных контактов активирует сигнальный путь через киназу RhoA и ее эффектор ROCK, что ведет к остеогенной дифференцировке, тогда как сохранение клетками округлой формы способствует ингибированию RhoA и коммитированию к адипогенезу [McBeath et al., 2004]. Возможно, именно этот механизм – активация RhoA за

счет напряжения, создаваемого актином и миозином при распластывании клеток – ответственен за наблюдаемое нами подавление адипогенеза на фибронектине и коллагене, обеспечивающих более прочную по сравнению с пластиком и ламинином адгезию МСК.

7. Экспериментальные подходы к изучению дифференцировки MCK *in vivo*

Большинство имеющихся в литературе данных о дифференцировке МСК в различных направлениях и молекулярных механизмах ее регуляции получены в экспериментах по культивированию клеток в индукционных средах. Очевидные преимущества этого подхода состоят в возможности контролировать состав среды и индивидуально оценивать влияние каждого ее компонента на те или иные стадии дифференцировки, а также в удобстве прижизненного наблюдения за ходом процесса. Однако культивирование МСК *in vitro* не позволяет полностью воспроизвести их микроокружение в организме, из-за чего результаты индукции дифференцировки могут быть не вполне адекватны естественному поведению клеток *in vivo*. Так, в остеогенной среде МСК приобретают специфические маркеры костной дифференцировки и откладывают соли Ca^{2+} , но не формируют костных балок с окруженными матриксом остеоцитами, а в адипогенной среде, несмотря на накопление клетками нейтральных жиров, практически не образуются унилокулярные адипоциты, подобные составляющим белую жировую ткань. Между тем знания о том, как МСК реализуют свои потенции к дифференцировке в естественных условиях организма, не только важны для понимания их биологии и функций, но и имеют несомненную ценность для медицинской практики.

Мы исследовали дифференцировку зародышевых и зрелых МСК *in vivo*, используя различные экспериментальные модели, а именно трансплантацию клеток в составе тканевых фрагментов, в диффузионных камерах и на трехмерных пористых носителях.

7.1. Трансплантация МСК зародышевой печени в составе тканевых фрагментов

Экспериментальная модель эктопической трансплантации кроветворных тканей под капсулу почки животного-реципиента была разработана в первую очередь для оценки способности стромальных родоначальных клеток к формированию новых кроветворных территорий и анализа регуляторных взаимодействий между кроветворными клетками и стромой. Известно, что в костном мозге мыши, пересаженном таким образом сингенному реципиенту, начинаются процессы пролиферации и дифференцировки стромальных предшественников, ведущие к формированию костной раковины с костномозговой стромой донорского происхождения, которая заселяется кроветворными клетками и поддерживает
гемопоэз [Tavassoli, 1984; Schofield, 1986]. Трансплантация зрелой селезенки приводит к регенерации ее ткани с характерным топографическим подразделением на белую и красную пульпу [Старостин, 1984]. Наиболее сложные морфогенетические преобразования наблюдаются в трансплантатах печени зародышей мыши: через 3-5 суток формируется хрящевая ткань, которая затем гипертрофируется, разрушается и к 12-14-м суткам после трансплантации



замещается костью с кроветворящим

костномозговым органом [Старостин, Домарацкая, 2001].

В связи с тем, что в настояшей работе ЛЛЯ исследования дифференцировочных потенций применялись МСК В основном OT крысы, представляло интерес протестировать ранее не изученную способность стромальных клеток этого вида животных к дифференцировке при эктопической трансплантации зародышевой печени. Пересаживаемую аллогенную ткань ΜЫ помещали в разрез почки,

Рисунок 40. Хондрогенез в эктопических трансплантатах печени зародышей крысы: а – печень 14-суточных зародышей, 13 суток после трансплантации; б – печень 16-суточных зародышей, 7 суток после трансплантации; в – печень 16-суточных зародышей, 35 суток после трансплантации; г – печень 20суточных зародышей, 14 суток после трансплантации. Окрашивание гематоксилин-эозином (а, г), альциановым синим, гематоксилином и эозином (б), толуидиновым синим (в). Увел.: об. x20, ок. x10 (а); об. x10, ок. x10 (б, в); об. x4, ок. x10 (г).

так как анатомические особенности строения почки крысы, в отличие от мыши, не позволяют осуществлять трансплантацию под капсулу.

Через 7-14 суток после трансплантации печени 14- или 16-суточных зародышей на месте операции отмечалось разрастание соединительной ткани, в некоторых случаях сильно выступающей над поверхностью почки. Ткань трансплантата была богата клетками и кровеносными сосудами, иногда содержала гигантские клетки инородных тел и скопления лейкоцитов. Через 35 суток после трансплантации соединительная ткань обычно становилась

более плотной, с преобладанием межклеточного вещества, ее инфильтрация лейкоцитами уменьшалась. В единичных трансплантатах встречались очаги гемопоэза, содержащие кроветворные клетки различной зрелости (рисунок А.17), что свидетельствует о сохранении способности стромальных клеток пересаженной печени к переносу кроветворного микроокружения. Однако в подавляющем большинстве трансплантатов гемопоэз отсутствовал.

В некоторых случаях уже через 7 суток после операции в трансплантатах (обычно в их периферической части) выявлялись островки гиалинового хряща округлой или более сложной формы [Паюшина и др., 2011]. В отличие от клеточных агрегатов, образуемых МСК в микромассовых культурах под влиянием индукторов хондрогенеза, хрящевая ткань имела типичную структуру с изогенными группами хондроцитов и большим количеством матрикса, содержащего гликозаминогликаны (рисунок 40 а, б). Очевидно, микроокружение, создаваемое различными клеточными компонентами трансплантата в совокупности с клетками и гуморальными факторами реципиента, обеспечивало содержащимся в печени МСК лучшие условия для реализации хондрогенных потенций, чем индукционная среда in vitro. Интересно, что в ранее проведенных экспериментах по эктопической трансплантации костного мозга как крысы, так и мыши хондрогенеза не наблюдалось: у крысы трансплантаты содержали в основном жировую ткань и небольшое количество костной, у мыши преобладал остеогенез, хотя строма формирующегося костномозгового органа содержала также и адипоциты (В.И. Старостин, неопубликованные данные). После 35 суток пребывания трансплантатов печени в организме реципиента хрящ не проявлял признаков деградации, сохраняя ту же структуру, что и через 7-14 дней после операции (рисунок 40 в). Встречаемость очагов хондрогенеза в различные сроки опыта не превышала 10% в случае 14-суточных зародышей и составляла 10-40% в случае 16-суточных (таблица 14). В трансплантатах печени 20-суточных зародышей хондрогенез отсутствовал; на всех изученных сроках пребывания в организме реципиента они содержали лишь соединительную ткань (рисунок 40 г). Сходные результаты были получены и авторами экспериментов на мышах, обнаружившими хондрогенез в трансплантатах печени от 14-суточных зародышей, но не от новорожденных животных [Старостин, Домарацкая, 2001].

Возпаст запольщией - донопов	Срок пребывания трансплантата в организме		
Бозраст зародышея - допоров	7 суток	13-14 суток	35 суток
14 суток	0/6	1/10	0/9
16 суток	2/10	1/10	4/10
20 суток	0/8	0/10	0/10

Таблица 14. Хондрогенез в эктопических трансплантатах печени зародышей

Примечание. В числителе – число трансплантатов, содержащих очаги хондрогенеза; в знаменателе – общее число трансплантаций.

Таким образом, при эктопической трансплантации печени зародышей крысы мы не отмечали показанного ранее на мышах замещения образующихся островков хряща костной тканью с очагами гемопоэза [Старостин, Домарацкая, 2001]. Не исключено, что у мыши МСК зародышевой печени обладают более выраженными потенциями к остеогенезу, чем у крысы. В пользу этого предположения свидетельствуют данные некоторых авторов о способности МСК из печени зародышей мыши к отложению Ca^{2+} в остеогенной среде [Wang et al., 2005 a], хотя другие исследователи сообщают о крайне слабой минерализации внеклеточного матрикса в подобных культурах [Fromigue et al., 2008]. Судя по частоте образования хряща, потенции МСК зародышевой печени крысы к дифференцировке в данной экспериментальной системе зависят от стадии индивидуального развития и теряются в позднем пренатальном онтогенезе.

7.2. Трансплантация МСК в диффузионных камерах

Начиная с пионерских работ Фриденштейна [Фриденштейн и др., 1969; 1970] трансплантация клеток кроветворных органов в диффузионных камерах служит эффективным подходом к изучению их дифференцировки. Применение этого метода позволило получить одни из первых доказательств остео- и хондрогенных потенций стромальных клеток костного мозга [Ashton et al. 1980; Bab et al., 1986; Friedenstein et al., 1987]. Его преимущества связаны с тем, что диффузионная камера представляет собой закрытую систему, исключающую проникновение клеток реципиента, так что обнаружение в ней той или иной ткани позволяет с уверенностью утверждать происхождение этой ткани из клеток, исходно помещенных в камеру.

Мы использовали данную экспериментальную модель для сравнительного исследования дифференцировки МСК из костного мозга и зародышевой печени и оценки изменения их потенций в ходе пассирования. Результаты экспериментов представлены в таблицах Б.3 и Б.4.

7.2.1. Свежевыделенные клетки

Прежде всего, мы проанализировали судьбу клеток зрелого костного мозга или печени 16-суточных зародышей крысы, помещенных в диффузионные камеры без предварительного культивирования *in vitro*. Очевидно, эта высокогетерогенная популяция содержала множество кроветворных и других клеток, могущих создавать микроокружение для трансплантируемых МСК и наряду с гуморальными факторами реципиента влиять на их дифференцировку.

Гистологический анализ срезов диффузионных камер, заполненных клетками костного мозга, показал, что после 42 суток пребывания в перитонеальной полости крысы-реципиента большинство из них содержали значительное количество волокнистой соединительной ткани,

заполняющей большую часть камеры, а в некоторых имелись также участки хрящевой и костной тканей. Хрящевая ткань имела вид тонких пластин, прилежащих с внутренней стороны к стенкам камеры и без резкой границы переходящих в губчатую кость сложной разветвленной формы. Между костными балками, покрытыми слоем остеобластов, выявлялась костномозговая строма с жировыми клетками и очагами гемопоэза (рисунок 41 a, б).

В экспериментах других авторов, трансплантировавших в диффузионных камерах некультивированные клетки костного мозга крысы [Mardon et al., 1987] или кролика [Ashton et al., 1980; Bab et al., 1986], также образовывались фиброзная, костная и хрящевая ткани. Однако судьба кроветворных клеток, содержащихся в трансплантате, у разных видов животных была



Рисунок 41. Срезы диффузионных камер с некультивированными клетками зрелого костного мозга (a, б) и печени 16-суточных зародышей (в, г) через 42 суток после трансплантации в перитонеальную полость крысы. Окрашивание альциановым синим, гематоксилином и эозином. Увел.: об. x4, ок. x10 (a, в); об. x 40, ок. x10 (б, г). неодинакова: у кроликов отмечалось постепенное снижение их числа [Ваb et al., 1986], а у крыс активный рост Ben-Ishay, Sharon, 1977]. Возможно, стромальные более клетки крысы эффективно организуют условиях В данных кроветворное

микроокружение, о чем может говорить и отмеченный нами гемопоэз в диффузионных камерах.

Клетки из печени зародышей через 42 дня

после трансплантации образовывали на внутренней поверхности стенок камеры лишь тонкий слой соединительной ткани или не образовывали ее вообще. Однако некоторые камеры содержали участки зрелой костной ткани с остеоцитами, окруженными большим количеством матрикса, но без остеобластов (рисунок 41 в, г). Наши наблюдения указывают на способность клеток из печени к терминальной костной дифференцировке, несмотря на то, что МСК данного органа не проявляют эту способность при культивировании в остеогенной среде *in vitro*.

Обращает на себя внимание то обстоятельство, что при в целом сходных условиях трансплантации стромальных предшественников в диффузионных камерах и в составе

тканевых фрагментов (отсутствие стадии культивирования *in vitro*, присутствие в трансплантате кроветворных клеток и прочих клеточных компонентов тканевого окружения МСК), характер дифференцировки клеток из одного и того же источника в этих моделях неодинаков. Так, в диффузионных камерах с клетками печени зародышей мы не наблюдали хондрогенеза, тогда как при трансплантации этого органа в почку формировалась хрящевая ткань и отсутствовала костная. Напротив, клетки костного мозга в диффузионных камерах образовывали хрящ, отсутствовавший в вышеупомянутых экспериментах Старостина и соавторов по эктопической трансплантации тканевого фрагмента костного мозга. Возможно, отличия в направлении дифференцировки стромальных клеток в диффузионных камерах от их судьбы в эктопически трансплантированных органах связаны с разрушением структуры пересаживаемой ткани в ходе приготовления суспензии либо с отсутствием непосредственных взаимодействий с клетками реципиента, имеющих место при трансплантации тканевого фрагмента в почку.

7.2.2. Пассируемые МСК

Помимо трансплантации гетерогенной по составу суспензии свежевыделенных клеток костного мозга и зародышевой печени, мы провели эксперименты по пересадке в диффузионных камерах стромальных клеток из тех же источников после 1-4 пассажей в стандартной ростовой среде, что позволяло оценить потенции МСК в отсутствие возможных регуляторных влияний со стороны их естественного микроокружения и проанализировать изменение этих потенций в ходе культивирования *in vitro*.

При трансплантации пассируемых МСК костного мозга степень развития соединительной ткани и встречаемость очагов остео- и хондрогенеза варьировали от опыта к опыту, но были сопоставимы для клеток 1-го, 2-го и 3-го пассажей. Костная ткань, содержащая остеоциты и иногда также остеобласты, примыкала к поверхности камеры и граничила с хрящом, расположенным глубже и местами демонстрировавшим признаки деградации (рисунок 42 а-г). В некоторых случаях обнаруживалась только костная ткань, тогда как хрящ отсутствовал.

В камерах, содержащих МСК зародышевой печени 1-4-го пассажей, образовывалась только соединительная ткань в количестве, не зависящем от длительности их предшествующего пассирования *in vitro* (рисунок 42 д-3). Костная и хрящевая ткани обнаружены не были.

Полученные результаты показывают, что МСК костного мозга крысы на протяжении по крайней мере трех пассажей сохраняют исходную способность к остео- и хондрогенезу *in vivo*, а остеогенные потенции клеток из печени зародыша теряются в процессе культивирования. Возможно, реализация этих потенций требует каких-либо регуляторных влияний со стороны



Рисунок 42. Срезы диффузионных камер с пассируемыми МСК через 49 суток после трансплантации в перитонеальную полость крысы: а, б – МСК костного мозга, 1-й пассаж; в, г – МСК костного мозга, 2-й пассаж; д, е – МСК печени 16-суточных зародышей, 1-й пассаж; ж, з – МСК печени 16-суточных зародышей, 2-й пассаж. Окрашивание альциановым синим, гематоксилином и эозином. Увел.: об. х4, ок. х10 (а, в, д, ж); об. х 40, ок. х10 (б, г, е, з).

других клеток печени. В этой связи интересны данные Фриденштейна и соавторов, показавших, что стромальные клетки из селезенки морской свинки, неспособные к спонтанному остеогенезу в диффузионных камерах, всё же образуют в них костную ткань при совместной трансплантации с эпителием мочевого пузыря [Фриденштейн и др., 1970]. Не исключено, что подобные индукторы, способствующие проявлению скрытых остеогенных потенций, существуют и для МСК из печени зародышей крысы, однако сведений о них в литературе нет.

7.3. Оценка пригодности различных материалов в качестве носителей для МСК

Еще один экспериментальный прием исследования дифференцировки МСК *in vivo* – их трансплантация на трехмерных пористых носителях, загружаемых клетками непосредственно перед трансплантацией [Dennis et al., 1992; Martin et al., 1997; Wang et al., 2006] или используемых как субстраты для их культивирования *in vitro* с последующим переносом в

организм животного-реципиента [Dong et al., 2001; Aung et al., 2002]. Ряд авторов рассматривают образование эктопической кости с кроветворящей костномозговой стромой при имплантации МСК на носителях (наряду с остео-, адипо- и хондрогенной дифференцировкой *in vitro*) как «золотой стандарт» для оценки принадлежности изучаемой популяции клеток к категории стволовых [Abdallah, Kassem, 2008]. Широкое распространение методов трансплантации МСК на носителях связано прежде всего с актуальностью проблемы разработки тканеинженерных конструкций для замещения дефектов костной, хрящевой и других тканей, что является одним из перспективных направлений интенсивно развивающейся в последние годы регенеративной медицины [Марквичева и др., 2011; Швед, 2011].

Успешная экспериментальная или клиническая трансплантация МСК требует удовлетворения ряда требований к материалу носителя. Он должен эффективно обеспечивать адгезию и пролиферацию клеток с сохранением их потенций и поддерживать создание трехмерной структуры, свойственной нормальной ткани. При этом материал не должен быть цитотоксичным, вызывать у реципиента воспалительную реакцию либо препятствовать врастанию сосудов и интеграции имплантированной конструкции в окружающую ткань.

Мы протестировали ряд материалов, изготовленных на основе натуральных и синтетических полимеров, на пригодность к использованию в качестве носителей для МСК, оценивая их биосовместимость и способность поддерживать выживание и рост стромальных клеток из костного мозга или зародышевой печени *in vitro* и/или после трансплантации в организм реципиента. Результаты проведенных исследований сведены в таблицу Б.5.

7.3.1. Биоматериалы на основе костного матрикса

Регенеративные биоматериалы на основе костного матрикса «Остеопласт-М» и «Остеопласт-Т» (рисунок 43 а, г) представляют собой пористые блоки высокоочищенного деминерализованного («Остеопласт-М») или не деминерализованного («Остеопласт-Т») матрикса губчатой кости свиньи, содержащего коллаген и сульфатированные гликозаминогликаны. Остеокондуктивные и остеоиндуктивные свойства этих материалов позволяют использовать их в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии для заполнения костных дефектов и стимуляции репаративного остеогенеза [Модина и др., 2008].

В наших экспериментах данные материалы показали хорошую совместимость с организмом крысы-реципиента при имплантации в почку. Через 1-2 месяца после операции они зарастали богато васкуляризованной соединительной тканью, плотно заполнявшей их поры. Оба материала не вызывали выраженного воспаления, инфильтрация лейкоцитами обычно была незначительной. «Остеопласт-М» за время пребывания в организме в значительной

степени резорбировался (рисунок 43 б), а структура «Остеопласта-Т» сохранялась почти неизменной, признаки ее разрушения отмечались лишь в отдельных участках (рисунок 43 д).

Однако культивирование МСК из костного мозга или печени 16-суточных зародышей крысы на этих материалах показало неспособность последних обеспечивать длительный рост клеток *in vitro*. Анализ срезов носителей, проинкубированных с МСК в течение 3-7 суток, показал присутствие близ поверхности и в порах обоих материалов немногочисленных клеток, расположенных поодиночке или небольшими группами. «Остеопласт-Т», прокультивированный с МСК (в отличие от контрольных образцов, инкубированных 5 суток в среде без клеток), имел признаки некоторого разрушения структуры, клетки преимущественно располагались в разрыхленных участках и, как правило, имели округлую форму (рисунок 43 е). Степень заселения клетками «Остеопласта-М» была несколько большей; в некоторых местах они имели морфологию распластанных фибробластов, в 2-3 слоя покрывающих поверхность



Рисунок 43. Биоматериалы на основе костного матрикса в качестве носителей для культивирования и трансплантации МСК: а – «Остеопласт-М» с клетками первичной культуры костного мозга крысы, нанесенными непосредственно перед трансплантацией; б – «Остеопласт-М» через 31 сутки после трансплантации в почку крысы; в – «Остеопласт-М» после 3 суток инкубации in vitro с клетками из печени 16-суточных зародышей крысы (1-й пассаж); г – «Остеопласт-Т» перед трансплантацией; д – «Остеопласт-Т» через 35 суток после трансплантации в почку крысы; е – «Остеопласт-Т» после 5 суток инкубации in vitro с клетками первичной культуры костного мозга крысы. Клетки показаны сплошными стрелками, материал носителя в трансплантате – пунктирными. Окрашивание гематоксилин-эозином. Увел.: об. х10, ок. х10 (а); об. х4, ок. х10 (б, г, д); об. х40, ок. х10 (в, е). носителя (рисунок 43 в), что может указывать на лучшую способность этого материала обеспечивать адгезию МСК по сравнению с «Остеопластом-Т». При продлении инкубации до 14-21 суток число клеток на поверхности и в порах обоих носителей не увеличивалось, а после 28–31 суток они становились крайне малочисленными и часто имели признаки деградации.

Нанесение клеточной суспензии на блоки «Остеопласта-М» непосредственно перед трансплантацией также не позволяло эффективно загрузить носитель клетками (см. рисунок 43 а). Гистологическая картина, наблюдаемая через месяц после трансплантации животным носителей с МСК, не отличалась от таковой при трансплантации контрольных образцов тех же материалов без клеток. Признаков хондро- или остеогенной дифференцировки выявлено не было, вероятно, ввиду недостаточного содержания МСК в трансплантированных носителях.

7.3.2. Коллаген-хитозановая матрица

Раневое покрытие для плоскостных дефектов кожи на основе коллаген-хитозанового комплекса представляет собой микропористую губку, основными компонентами которой являются коллаген быка и высоко деацетилированный хитозан. Включение в состав этого материала гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата, гепарина, сывороточного фактора роста и аскорбиновой кислоты улучшает его способность обеспечивать регенерацию кожи благодаря созданию благоприятных условий для пролиферации фибробластов, правильной ориентации образуемых ими волокон и формирования микрососудов [Большаков и др., 2005 а]. Использование коллаген-хитозановой матрицы в качестве носителя для культивирования эмбриональных фибробластов позволило создать *in vitro* тканеинженерную конструкцию, пригодную для трансплантации на место дефекта кожи [Большаков и др., 2005 б] и сократить сроки заживления ожоговых ран в экспериментах на крысах [Большаков и др., 2008].

Микроскопическое исследование срезов носителя показало, что он полностью сохраняет свою структуру при инкубации в культуральной среде *in vitro* в течение по меньшей мере месяца (рисунок 44 а), однако через 35-56 суток после трансплантации в почку или под кожу реципиента полностью или частично резорбируется, замещаясь соединительной тканью. При инкубации коллаген-хитозановой матрицы, предварительно выдержанной в среде, с МСК костного мозга или зародышевой печени *in vitro* в течение 3-31 суток разрушения материала не наблюдалось. Клетки свободно лежали в порах либо прикреплялись к их стенкам, иногда распластываясь по ним. Они располагались поодиночке или образовывали скопления из 5-10 клеток (рисунок 44 б), но, как правило, не заполняли поры целиком. В ходе культивирования число клеток существенно не менялось; на поздних сроках (28-31 суток) некоторые из них имели признаки деградации, но встречались и клетки с нормальной структурой. Результаты

трансплантации МСК на коллаген-хитозановой матрице крысам-реципиентам в большинстве случаев не отличались от таковых при имплантации контрольных образцов материала без клеток: на месте операции обнаруживалось разрастание соединительной ткани, степень развития которой варьировала у разных животных независимо от присутствия МСК в трансплантате, и иногда сохранялись остатки материала носителя (рисунок 44 г).

При помещении коллаген-хитозановой матрицы в клеточную суспензию в сухом состоянии клетки проникали в материал более эффективно, чем при предварительном насыщении его средой; в этом случае их содержание в носителе было достаточно высоким, а распределение по его объему сравнительно равномерным (рисунок 44 в), тогда как носитель, предварительно выдержанный в среде, содержал клетки преимущественно на поверхности или неглубоко под ней. Более того, при трансплантации первичной культуры МСК костного мозга



Рисунок 44. Культивирование и трансплантация МСК на коллаген-хитозановой матрице: а носитель после 31 суток инкубации в культуральной среде без клеток; б – МСК из печени 16-суточных зародышей крысы (1-й пассаж) в порах носителя; 31 сутки культивирования in vitro (клетки показаны стрелкой); в - МСК из костного мозга крысы (первичная культура) после 21 суток культивирования на носителе (материал помещен в клеточную суспензию в сухом состоянии без предварительного насыщения средой; клетки показаны стрелками); г – резорбция носителя с первичной культурой клеток костного мозга через 35 суток после трансплантации в почку крысы (остатки материала показаны стрелками); д, е – костная ткань на месте трансплантации носителя с первичной культурой клеток кольторой клеток костного мозга в почку крысы; 35 суток in vivo. Окрашивание гематоксилин-эозином (а-г, е) или по Маллори (д). Увел.: об. x4, ок. x10 (а, д); об. x20, ок. x10 (б, г); об. x40, ок. x10 (в); об. x10, ок. x10 (е).

на носителе, загруженном клетками без предварительного насыщения средой и содержащем значительное их число, у одного из реципиентов трансплантат содержал небольшой участок костной ткани, без резкой границы переходящей в фиброзную (рисунок 44 д, е).

Таким образом, коллаген-хитозановый носитель демонстрировал не только совместимость с организмом реципиента, но и способность обеспечивать выживание культивируемых на нем МСК с сохранением их остеогенных потенций. Однако для эффективной трансплантации МСК на данном материале с получением воспроизводимых результатов требуется совершенствование методов загрузки носителя клетками.

7.3.3. Гемостатическая коллагеновая губка

В работе Ванга и соавторов [Wang et al., 2006], посвященной анализу потенций субпопуляции МСК, устойчивой к 5-ФУ, в качестве носителя для трансплантации клеток костного мозга была использована желатиновая гемостатическая губка Gelfoam (Pharmacia & Upjohn, США). Мышам и крысам за 5 суток до взятия костного мозга вводили 5-ФУ и затем трансплантировали свежевыделенные клетки, нанесенные на губку, под кожу иммунодефицитных мышей. В случае трансплантации большого числа клеток (2-4 млн) от животных, получивших 5-ФУ, спустя 5 недель формировалась костная ткань с костномозговым органом, содержащим адипоциты и кроветворную строму.

Мы провели аналогичное исследование с применением гемостатической губки отечественного производства, изготовленной из коллагена с добавлением нитрофурала (фурацилина) и борной кислоты. На сухие фрагменты губки в малом объеме среды (100 мкл) наносили 4x10⁶ клеток, выделенных из костного мозга крыс через 5 суток после инъекции 5-ФУ в дозе 50 мг/кг, либо свежевыделенные клетки костного мозга интактных крыс. Непосредственно после нанесения клеток носитель трансплантировали в почку.

Как показало гистологическое исследование губки перед трансплантацией, клетки были сосредоточены в месте нанесения суспензии, локализуясь вблизи поверхности и неглубоко проникая в подповерхностный слой. В этом участке присутствовало значительное количество клеток, как правило, прикрепленных к материалу носителя и часто контактирующих между собой (рисунок 45 а). В областях губки, расположенных вдали от места нанесения клеток, они встречались реже и располагались поодиночке или группами по 2-3.

Через 42 дня после трансплантации губки с клетками на месте операции обнаруживался соединительнотканный рубец, размер которого варьировал у разных реципиентов независимо от того, получал ли донор клеток инъекцию 5-ФУ. Остатки носителя в трансплантате не выявлялись, морфологические признаки дифференцировки МСК отсутствовали (рисунок 45 б,



Рисунок 45. Трансплантация свежевыделенных клеток костного мозга на гемостатической коллагеновой губке: а – губка с нанесенными на нее клетками от интактных крыс; б – почка крысы-реципиента через 42 суток после трансплантации носителя с клетками интактных доноров; в - почка крысы-реципиента через 42 суток после трансплантации носителя с клетками доноров, получивших инъекцию 5-ФУ. Окрашивание гематоксилинэозином. Увел: об. x20, ок. x10 (a); об. x4, ок. x10 (б); об. x10, ок. x10 (в).

в). По-видимому, быстрое рассасывание губки в организме реципиента не позволяло удержать клетки в месте трансплантации на протяжении времени, достаточного для образования дифференцированной ткани. Это обстоятельство ставит под сомнение пригодность данного материала для создания тканеинженерных конструкций, несмотря на его высокую способность абсорбировать нанесенную клеточную суспензию. Быстрая деградация коллагеновых губок, могущая затруднить их использование в качестве носителей для культивирования и трансплантации MCK, отмечалась и другими авторами [Donzelli et al., 2007].

7.3.4. Криогели

Криогели представляют собой высокопористые гелевые материалы, образуемые из неглубоко замороженных растворов мономерных или полимерных предшественников. В зависимости от свойств и концентрации предшественников, а также режимов криотропного гелеобразования возможно получение криогелей различной химической природы и структуры. Они могут быть использованы для хроматографического разделения биологических нано- и микрочастиц (плазмид, вирусов, органелл), а также как носители для иммобилизации биомолекул и клеток [Lozinsky et al., 2003]. Преимущества криогелей состоят в широкопористой морфологии, благоприятствующей проникновению трансплантируемых клеток вглубь материала и врастанию кровеносных сосудов реципиента, и возможности варьировать химический состав, включая в него компоненты, способствующие адгезии и росту

клеток (гидрофобные химические группы, фрагменты матриксных белков и т.п.). Сообщалось об успешном применении криогелей различного состава для культивирования МСК [Петренко и др., 2008; Saino et al., 2011; Rodriguez-Lorenzo et al., 2012], фибробластов [Дроздова и др., 2011; Bhat, Kumar, 2012], хондроцитов [Hwang et al., 2010; Bölgen et al., 2011], остеобластов (Rodriguez et al., 2012), клеток мышечной (Singh et al., 2010; Bhat, Kumar, 2012] и нервной тканей [Jurga et al., 2011] с целью создания тканеинженерных конструкций. Мы использовали для культивирования и трансплантации МСК костного мозга и зародышевой печени криогели, изготовленные из коллагена, диметилакриламида либо материалы на основе агарозы.

7.3.4.1. Коллагеновый криогель

Криогель, приготовленный из раствора коллагена, был использован как субстрат для культивирования МСК костного мозга. С целью усиления адгезии клеток к материалу часть носителей предварительно обрабатывали раствором фибронектина или добавляли его в среду. Результаты анализировали через 4, 11 и 21 суток после начала культивирования.

На ранних сроках культивирования (4 и 11 суток) степень заселения криогеля клетками была низка, но к 21 суткам их число несколько возрастало. Кроме того, со временем повышалась доля распластанных клеток с морфологией фибробластов: если через 4 суток большинство клеток были круглыми, то через 21 сутки преобладали распластанные, часто образующие рыхлые или плотные скопления по 8-10 клеток (рисунок 46 а). Иногда они покрывали стенки пор сплошным слоем, но не заполняли их целиком. Признаков гибели клеток практически не отмечалось. Предварительное выдерживание криогеля в растворе фибронектина или добавление последнего в среду приводило к увеличению содержания клеток в носителе, однако этот эффект наблюдался лишь на ранних сроках культивирования (4 суток), тогда как через 21 сутки число и форма клеток не отличались от таковых без фибронектина. Однако, несмотря на некоторый рост числа клеток в ходе культивирования, их содержание в носителе всё же оставалось невысоким и едва ли достаточным для формирования дифференцированной ткани *in vivo*, из-за чего эксперименты по трансплантации МСК на коллагеновом криогеле проведены не были. Попытки повысить количество клеток в носителе путем нанесения концентрированной суспензии (6х10⁶ клеток в 100 мкл среды) на подсушенный материал с последующим добавлением ростовой среды не привели к успеху: после 14 суток культивирования численность клеток была высокой, но большинство из них имели признаки гибели, а число живых распластанных фибробластов было сопоставимо с таковым при стандартном методе засева (помещение фрагментов носителя во взвесь клеток).



Рисунок 46. Культивирование МСК костного мозга (а) и печени 16-суточных зародышей (б—и) крысы на полимерных криогелях: а – коллагеновый криогель, 21 сутки культивирования; б – криогель из немодифицированной агарозы, 3 суток культивирования; в – агарозный криогель с алкильными группами из 8 атомов углерода, 3 суток культивирования; г – агарозный криогель с алкильными группами из 12 атомов углерода, 3 суток культивирования; д – агарозный криогель с 1,5% привитой желатины, 3 суток культивирования; е – агарозный криогель с 2,5% привитой желатины, 3 суток культивирования; е – агарозный криогель с 2,5% привитой желатины, 3 суток культивирования; е – агарозный криогель с 2,5% келатины, 7 суток культивирования; з – криогель из смеси 1,5% агарозы и 1,5% желатины, 7 суток культивирования; и – диметилакриламидный криогель, 3 суток культивирования. Окрашивание гематоксилин-эозином. Увел: об. х40, ок. х10.

Таким образом, культивирование на коллагеновом криогеле, по-видимому, создает благоприятные условия для адгезии и длительного выживания МСК, что может указывать на его перспективность в качестве носителя. Не исключено, что более эффективному заполнению криогеля клетками может способствовать изменение состава среды с целью усиления их пролиферативной активности (повышение содержания сыворотки, добавление факторов роста и т.д.) или более длительное культивирование.

7.3.4.2. Криогели на основе агарозы

Криогели, содержащие агарозу – полисахарид из морских водорослей – считаются перспективными материалами для тканеинженерных конструкций [Петренко и др., 2008; Bhat, Kumar, 2012]. Помимо наличия взаимосвязанных пор, присущего криогелям любого состава, преимущества носителей на основе агарозы состоят в ее иммунологической инертности, а также в длительном сохранении носителя в организме реципиента ввиду отсутствия агаролитических ферментов, что обеспечивает поддержание объема и формы трансплантата.

В наших экспериментах по культивированию МСК из печени зародышей на немодифицированном агарозном криогеле была выявлена слабая способность этого материала обеспечивать адгезию клеток. После 3-10 суток культивирования клетки на поверхности и в порах носителя были малочисленными и, как правило, нераспластанными. Они чаще располагались поодиночке или мелкими группами, реже образовывали крупные конгломераты в виде гроздьев или покрывали поверхность носителя (рисунок 46 б). Более продолжительное (21-28 суток) культивирование сопровождалось откреплением и/или гибелью клеток.

Модификация поверхностных свойств агарозного криогеля прививкой гидрофобных цепей не приводила к более эффективному прикреплению и росту МСК. После 3 дней культивирования на носителе с алкильными группами из 12 атомов углерода число клеток было сопоставимо с таковым на криогеле из чистой агарозы, а на носителе с привитыми алкильными группами из 8 атомов углерода – несколько меньшим (рисунок 46 в, г). Сходная картина наблюдалась и после 10 дней культивирования, причем подавляющее большинство клеток были нераспластанными. После 21–28 суток число клеток на этих носителях, как и на криогеле из немодифицированной агарозы, значительно снижалось. Следует отметить, что, по данным прижизненного наблюдения, в порах некоторых образцов носителей (как из чистой агарозы, так и с привитыми алкильными группами) после 23-28 суток культивирования обнаруживалось значительно больше клеток, чем при последующем анализе парафиновых срезов тех же образцов (рис А.18). Вероятно, слабая адгезия клеток, о чем свидетельствует круглая форма большинства из них, приводила к их потерям в процессе гистологической обработки материала.

Таким образом, мы не обнаружили выраженного влияния гидрофобных групп в составе носителя на адгезию и рост МСК. Однако была выявлена тенденция к более полному заселению клетками носителей с рыхлой структурой. Использованные образцы криогелей одного и того же состава варьировали по плотности материала и величине пор; при этом в более плотных образцах клетки располагались в основном у внешней поверхности и в участках разрушения, а в более рыхлых и пористых часто содержались и во внутренних областях. Вероятно, рыхлая структура материала способствовала лучшему проникновению клеток вглубь носителя.

Включение желатины агарозного В состав криогеля представляется более перспективным путем к улучшению его адгезивных свойств, чем прививка алкильных групп. Анализ носителей с различной концентрацией привитой желатины после 3 и 10 суток культивирования с МСК зародышевой печени показал присутствие на криогеле с 2,5% желатины значительного числа клеток, в основном распластанных. На носителе с 1,5% желатины клеток было меньше, однако распластанная форма большинства из них говорила об эффективном прикреплении к субстрату. На обоих носителях клетки часто формировали скопления по 5-10 и более, а в некоторых местах покрывали поверхность сплошным слоем (рисунок 46 д, е). На криогеле с 0,5% желатины встречались лишь немногочисленные, обычно округлые клетки. После 21-28 суток число клеток на всех этих носителях снижалось; при этом они обычно были нераспластанными и не образовывали крупных скоплений. Многие клетки к этому сроку приобретали признаки деградации.

Тенденция к стимулирующему влиянию желатины на адгезию МСК наблюдалась и при культивировании клеток костного мозга на криогелях из смеси агарозы с желатиной в разных пропорциях (2,5%:1,5%, 2%:2% и 1,5%:2,5%) (рисунок 46 ж, з). После 3 или 7 дней культивирования на этих носителях отмечалось в целом невысокое число клеток, в основном округлых. При этом криогель с 1,5% агарозы и 2,5% желатины через 3 дня содержал несколько больше клеток, чем носители с преобладанием агарозы либо равным соотношением ее с желатиной, а через 7 дней часть заселивших его клеток становились фибробластоподобными. В целом по числу клеток и степени их распластывания носители с наибольшим содержанием желатины (как привитой, так и в смеси с агарозой) были сравнимы с коллагеновым криогелем.

Имплантация агарозных криогелей с привитой желатиной в почку крысы показала их хорошую совместимость с организмом реципиента. Спустя 30-35 суток после имплантации как контрольных носителей, так и инкубированных с клетками, у всех животных отмечалось прорастание носителя богато васкуляризованной соединительной тканью с множеством коллагеновых волокон, макрофагами, фибробластами и многочисленными гигантскими клетками инородных тел; инфильтрация лейкоцитами отсутствовала или была незначительна. Резорбции носителя не наблюдалось (рисунок А.19 а). При имплантации криогеля под кожу в нем выявлялось несколько меньше соединительной ткани, и она была более рыхлой, чем при имплантации в почку (рисунок А.19 б). Отсутствие признаков воспаления и отторжения, а также наличие множества кровеносных сосудов свидетельствуют о благоприятных условиях для размножения и дифференцировки трансплантированных клеток.

Однако ни в одном из опытов по трансплантации криогелей с МСК признаков остео- или хондрогенеза отмечено не было, видимо, из-за недостаточного количества клеток в носителях. Возможно, оно может быть повышено путем дальнейшего (сверх изученных нами концентраций) увеличения содержания желатины в составе криогеля. Согласно сообщению других авторов, культивировавших на агарозном криогеле с привитой желатиной МСК из костного мозга человека, более полной загрузки данного носителя клетками можно добиться также постоянным перемешиванием или интенсивным встряхиванием [Петренко и др., 2008]. По их данным, при этих способах загрузки в первые 7 суток культивирования происходила пролиферация клеток в носителе. В наших опытах число клеток в эти сроки существенно не изменялось. Возможно, различия в результатах объясняются неодинаковыми методами анализа или тем, что при использованном нами стандартном способе засева носителя исходное число клеток в нем было недостаточным для эффективного роста. При этом открепление и гибель клеток после 3-4 недель инкубации могут указывать на неспособность криогелей на основе агарозы обеспечивать их длительное выживание и, следовательно, на бесперспективность продолжительного культивирования для улучшения заселения носителей клетками. Это обстоятельство является главным недостатком данных материалов как носителей для МСК.

7.3.4.3. Криогель из диметилакриламида с привитой желатиной

Диметилакриламид (диметиламид акриловой кислоты) представляет собой синтетический материал, используемый, в частности, для изготовления мягких контактных линз [Павлюченко, Иванчев, 2009]. В опытах по культивированию МСК костного мозга или зародышевой печени на криогеле из этого материала с привитой желатиной степень заселения носителя клетками была невысокой. Через 3 суток после посева на стенках пор и у поверхности встречались единичные, как правило, круглые клетки (рисунок 46 и). После 21 суток культивирования на отдельных участках обнаруживались группы из 3-4 клеток, иногда вытянутой формы, но общее число клеток увеличивалось незначительно. При этом МСК из печени зародышей заселяли носитель несколько эффективнее, чем клетки костного мозга.

При трансплантации в почку или под кожу диметилакриламидный криогель, как и агарозный, не разрушался, однако зарастал соединительной тканью сравнительно слабо, особенно в случае подкожной трансплантации. Как правило, соединительная ткань была рыхлой, содержала множество кровеносных сосудов и была обильно инфильтрирована мононуклеарными клетками. Встречались диффузные скопления эозинофилов, в местах контакта с носителем присутствовали многочисленные гигантские клетки инородных тел (рисунок А.19 в, г). Выраженные признаки воспаления при трансплантации этого материала

указывают на недостаточную совместимость с организмом, что в совокупности с малым числом клеток, оседающих на нем *in vitro*, препятствует его эффективному использованию в качестве носителя и не позволяет оценить потенции трансплантируемых на нем МСК к дифференцировке *in vivo*.

В целом по результатам наших экспериментов in vitro и in vivo наиболее перспективными материалами для применения в качестве носителей трансплантируемых МСК представляются коллаген-хитозановая матрица, коллагеновый криогель, агарозные криогели с высоким содержанием желатины и, возможно, «Остеопласт-М». Они в большей степени, чем способствуют протестированные материалы, адгезии распластыванию остальные И культивируемых клеток, хотя и не обеспечивают их активной пролиферации в использованных нами условиях. Однако количество клеток во всех изученных носителях (как непосредственно после нанесения, так и после инкубации in vitro) было слишком низким для успешной трансплантации. Анализ влияния данных носителей на потенции МСК к дифференцировке in vivo требует разработки более эффективных методов их заселения клетками, обеспечивающих содержание в них достаточного числа стромальных предшественников.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Со времени первых работ Фриденштейна, идентифицировавшего родоначальные клетки кроветворной стромы как КОЕ-Ф, и последующей разработки Капланом концепции мезенхимной стволовой клетки МСК рассматривались в мировой литературе преимущественно как клетки, дающие начало тем или иных разновидностям соединительной ткани и организующие кроветворное микроокружение. Появившиеся в последние годы данные о локализации МСК в некроветворных тканях и механизмах их участия в регенерации заставляют шире взглянуть на биологическую роль этого типа клеток. Однако организация кроветворной ниши является одной из важнейших функций МСК, что побудило нас избрать объектом настоящей работы стромальные клетки именно из органов гемопоэза.

В настоящее время неизвестно, происходят ли популяции МСК, присутствующие на разных стадиях онтогенеза в печени, селезенке и костном мозге, из одного источника. Косвенные свидетельства указывают на то, что МСК последовательно перемещаются в места активного гемопоэза при смене его локализации в ходе индивидуального развития. При этом остается неясным, какие изменения претерпевают МСК в ходе онтогенеза, как влияет на их свойства микроокружение заселяемых ими органов, и как изменения в популяции МСК отражаются на качестве организуемой ими кроветворной ниши.

Сравнительный анализ стромальных клеток, выделенных из костного мозга, печени и селезенки в различные периоды индивидуального развития, позволил нам проследить динамику изменения содержания и свойств МСК в каждом из этих органов и соотнести ее с активностью кроветворения. В качестве параметров для сравнения клеток из разных источников были избраны основные свойства, используемые как критерии для их отнесения к категории МСК и при этом наиболее доступные экспериментальному изучению – клоногенность, способность к адгезии, антигенный фенотип и потенции к дифференцировке в мезенхимные производные. Кроме того, мы оценили пролиферативную активность клеток из пре- и постнатальных источников и их чувствительность к 5-ФУ как цитотоксическому препарату избирательного действия.

Было показано, что в пределах каждого изученного органа присутствие на стромальных клетках характерных для МСК антигенов (CD73 и в меньшей степени CD90) и способность к остеогенезу *in vitro* коррелируют с активностью кроветворения на данной стадии развития, будучи максимальными в период наиболее активного гемопоэза. В случае печени и селезенки с активностью гемопоэза коррелируют также относительное содержание КОЕ-Ф и численность жировых клеток, образуемых в адипогенной среде. Кроме того, в эктопических трансплантатах печени зародышей на пике кроветворения хрящевая ткань формируется чаще, чем при

трансплантации этого органа на более ранней стадии онтогенеза, а в трансплантатах печени, выделенной в период угасания кроветворной активности, хондрогенез отсутствует. От состояния гемопоэза зависит и морфология колоний, образуемых КОЕ-Ф. Так, в разгар кроветворения в зародышевой печени ее стромальные клетки печени образуют плотные и достаточно крупные колонии, а на стадии его затухания – преимущественно мелкие и рыхлые. Возможно, микроокружение активно кроветворящих органов, организуемое всей совокупностью элементов их стромы, обеспечивает благоприятные условия для выживания, пролиферации и сохранения потенций не только СКК, но и других типов стволовых и родоначальных клеток, включая и МСК. Кроме того, сами кроветворные клетки могут оказывать регуляторное влияние на МСК, выступая в качестве компонента их ниши.

Нами также были обнаружены различия между МСК из разных органов, не связанные с состоянием гемопоэза. Так, способность к адипо- и хондрогенезу в индукционных средах, динамика адгезии к пластику или белкам внеклеточного матрикса МСК, выделенных из костного мозга половозрелых крыс и печени 16-суточных зародышей – органов с сопоставимой кроветворной активностью – значительно различаются. Неодинаковы и свойства резистентных к 5-ФУ популяций МСК из этих источников, что может указывать на различия в структуре стромального дифферона. Особенно ярко выражены различия в остеогенных потенциях МСК из костного мозга и зародышевой печени, выявленные нами при анализе спонтанной экспрессии ЩФ в колониях, образуемых КОЕ-Ф в первичной культуре, отложения минерализованного матрикса в остеогенной среде и формирования костной ткани *in vivo* в диффузионных камерах. Вероятно, подобные различия отражают органоспецифичность свойств МСК, связанную с особенностями клеточного состава и функций органов, являющихся их источниками.

Помимо межорганных различий в свойствах МСК, мы выявили зависимость некоторых их характеристик от стадии онтогенеза. Сравнительный анализ культур клеток от зародышей и половозрелых животных показал, что они различаются прежде всего пролиферативной активностью и темпами репликативного старения. Так, для МСК в пренатальном онтогенезе по сравнению с постнатальным характерны исходно более высокая доля циклирующих клеток и более позднее появление признаков старения культуры (снижения пролиферативной активности, накопления характерных морфологических изменений) в ходе пассирования. Повидимому, активная пролиферация МСК зародышей обусловлена интенсивным ростом органов в пренатальном онтогенезе, создающим повышенную потребность в стромальных клетках.

Реализация потенций МСК к дифференцировке в значительной степени зависит от условий микроокружения. Об этом свидетельствуют обнаруженные нами различия в характере дифференцировки МСК костного мозга и зародышевой печени в индукционных средах и при трансплантации животным-реципиентам. В частности, в наших экспериментах *in vitro* клетки из

печени зародышей демонстрировали лишь слабые признаки хондрогенеза и начальные стадии остеогенной дифференцировки, тогда как в трансплантатах тканевых фрагментов зародышевой печени отмечалось образование типичного гиалинового хряща, а в диффузионных камерах с некультивированными клетками этого органа изредка обнаруживались участки зрелой костной ткани. Очевидно, в экспериментах *in vitro* не удается соблюсти все условия, которые требуются для терминальной дифференцировки, причем эти условия могут различаться в зависимости от источника МСК. Более того, судьба клеток в организме реципиента может зависеть от способа их трансплантации. Так, клетки из печени зародышей, трансплантированные в составе тканевых фрагментов, образуют хрящевую ткань, но не костную, тогда как при трансплантации в диффузионных камерах они, напротив, проявляют остеогенные, но не хондрогенные потенции. Проведенные нами эксперименты указывают на то, что в условиях *in vivo* на дифференцировку МСК существенное влияние могут оказывать как факторы, поступающие из организма реципиента, так и разнообразные типы клеток, содержащиеся в трансплантируемой ткани – кроветворные, эндотелиальные и прочие. Может играть роль и пространственная организация ткани: в диффузионной камере, содержащей свежевыделенную суспензию клеток зародышевой печени, и эктопически трансплантированном фрагменте печеночной ткани клеточный состав трансплантата сходен, однако в первом случае межклеточные связи нарушены, а во втором сохранены, и, возможно, это обстоятельство определяет выбор направления дифференцировки МСК. При этом МСК из костного мозга отвечают на аналогичные условия трансплантации иначе, нежели клетки из зародышевой печени. Будучи трансплантированы в диффузионных камерах без предварительного размножения в культуре, они образуют одновременно и костную, и хрящевую ткани, а при эктопической трансплантации фрагментов костного мозга, согласно неопубликованным данным В.И. Старостина, формируется кость, но не хрящ, тогда как, по нашим данным, при трансплантации печени зародыша в аналогичных условиях образуется хрящевая ткань.

Возможно, выявленные нами различия в свойствах МСК в зависимости от органной принадлежности, стадии онтогенеза и активности гемопоэза в органе, являющемся их источником, отражают процесс развития кроветворной ниши, в построении которой МСК играют первостепенную роль. На основании полученных данных нами предложена следующая концепция формирования кроветворного микроокружения в онтогенезе. МСК, локализованные в транзиторных органах гемопоэза в пренатальный период, характеризуются функциональной незрелостью, которая проявляется в неспособности в полной мере реализовывать имеющиеся у них потенции к дифференцировке. Роль этой эмбриональной популяции МСК в организации кроветворной ниши может состоять главным образом в трофическом влиянии на кроветворные клетки путем контактных взаимодействий с ними, продукции цитокинов, хемоаттрактантов и

прочих регуляторных молекул. Результаты наших экспериментов с индукторами указывают на то, что в этот период МСК рефрактерны к стимулам, вызывающим дифференцировку, и приобретают способность откликаться на них только в ходе дальнейшего развития, о чем свидетельствует и клеточный состав кроветворной ниши. Так, в зрелом костном мозге она содержит клетки остеобластического ряда, адипоциты на различных стадиях дифференцировки и другие типы происходящих из МСК стромальных клеток, тогда как в кроветворном микроокружении зародышевых печени и селезенки они отсутствуют. Таким образом, роль дефинитивной популяции МСК в гемопоэзе состоит не только в регуляторных взаимодействиях с кроветворными клетками, что свойственно и эмбриональным МСК, но и в образовании различных клеточных компонентов кроветворной стромы, каждый из которых вносит собственный вклад в поддержание кроветворения. Возможно, именно изменение качества кроветворного микроокружения приводит к окончательному созреванию СКК, в частности, переходу от их активного размножения в зародышевой печени к состоянию цитокинетического покоя и самоподдержания в костном мозге половозрелого организма [Martin, Bhatia, 2005]. Это предположение подтверждается данными о нарушении гемопоэза у плодов мышей с мутацией гена Osterix, приводящей к отсутствию остеобластов: в их костном мозге СКК характеризуются повышенной пролиферативной активностью и неспособностью к заселению кроветворных органов реципиента [Coşkun et al., 2014].

В зрелой селезенке развитие кроветворной ниши, видимо, носит иной характер, обусловленный спецификой лимфопоэза: его поддержание осуществляется прежде всего фибробластами, но не клетками адипоцитарного и остеобластического рядов – следовательно не требуются и обеспечивающие воспроизводство этих клеток мультипотентные МСК. Возможно, они покидают селезенку либо теряют остео- и адипогенные потенции вследствие терминальной дифференцировки в фибробласты. Исчезновение МСК, очевидно, наблюдается и при затухании гемопоэза в печени, что еще раз подчеркивает их роль в организации кроветворного микроокружения: другие типы клеток, участвующие в поддержании гемопоэза в этом органе в пренатальный период (гепатоциты, эндотелиоциты, клетки Ито), сохраняются и в зрелой печени, однако в отсутствие МСК кроветворения в ней не происходит.

Вероятно, созревание популяции МСК в онтогенезе обусловлено двумя сопряженными механизмами – активацией в них определенных генов, обеспечивающих приобретение компетентности к дифференцировке, и влиянием со стороны микроокружения, изменяющегося в ходе развития и неодинакового в разных органах. Одними из факторов этого микроокружения могут быть компоненты внеклеточного матрикса, которые не только оказывают прямое влияние на кроветворные клетки [Weinstein et al., 1989; Siler et al., 2000], но, возможно, и определяют способность МСК к дифференцировке. Так, обнаруженное нами подавление остео-

и адипогенеза при культивировании МСК на фибронектине может свидетельствовать о том, что взаимодействие с этим белком блокирует их дифференцировку и в кроветворных органах зародыша. Не исключено, что созревание кроветворной ниши в онтогенезе сопровождается снижением содержания фибронектина во внеклеточном матриксе (и, соответственно, его ингибирующего влияния на дифференцировку МСК) или, напротив, появлением каких-то компонентов, способствующих реализации присущих МСК дифференцировочных потенций. Для проверки этой гипотезы требуется анализ состава внеклеточного матрикса как компонента ниши для МСК в кроветворных органах на разных стадиях развития.

Свойства МСК – способность к дифференцировке и продукции биоактивных молекул, нетребовательность к условиям культивирования, несклонность к образованию опухолей – делают их прекрасным материалом для применения в регенеративной медицине. При этом встает вопрос о выборе оптимального источника клеток, обеспечивающего эффективность и безопасность их введения пациенту. Наши результаты показали, что для создания тканеинженерных эквивалентов костной, жировой и, возможно, хрящевой ткани наиболее пригодным из всех изученных нами источников МСК является зрелый костный мозг, клетки которого наиболее способны к дифференцировке в этих направлениях. Использование в этих целях МСК из селезенки или печени плодов едва ли целесообразно, однако не исключено, что МСК из этих органов могут найти применение в протоколах клеточной терапии, основанных на трофическом влиянии трансплантируемых клеток на поврежденную ткань и требующих не дифференцировки, а продукции ими биологически активных молекул. В частности, их способность создавать кроветворную нишу могла бы быть использована для улучшения восстановления гемопоэза после миелоаблативной терапии. Прояснение вопроса о лучшем источнике клеток для этих целей, включающее оценку секреторной активности МСК различной локализации в ходе онтогенеза, заслуживает отдельного исследования, выходящего за рамки задач настоящей работы. Необходимо также учитывать, что ввиду высокой пролиферативной активности зародышевых МСК они могут быть в большей степени, чем клетки зрелого организма, подвержены злокачественной трансформации. Однако вопрос об их потенциальной туморогенности, важный с точки зрения безопасности клинического применения, также нуждается в дополнительном исследовании. Следует принимать во внимание и моральные аспекты трансплантации клеток, полученных от плодов, хотя эту проблему отчасти снимает строгое соблюдение правовых и этических норм использования абортивного материала.

Сложной и не вполне ясной проблемой, исследование которой представляет несомненную актуальность, в том числе для медицинской практики, остается и понимание регуляторных влияний микроокружения на реализацию дифференцировочных потенций МСК *in vivo*. Для изучения поведения МСК в организме реципиента необходим поиск оптимального

способа трансплантации этих клеток, обеспечивающего наиболее полное проявление их потенций. Это обстоятельство наряду с актуальностью проблемы разработки носителей для тканеинженерных конструкций побудило нас протестировать различные натуральные и синтетические материалы на пригодность к использованию в качестве трехмерных матриц для культивирования и трансплантации МСК. Изученные материалы, за исключением диметилакриламидного криогеля, были высоко совместимы с организмом реципиента, однако все они, к сожалению, оказались неэффективными в отношении прикрепления и размножения клеток и вследствие этого малопригодными для изучения дифференцировки MCK in vivo. Тем не менее, сравнительный анализ адгезии клеток к различным носителям выявил наиболее перспективные из них (в частности, коллаген-хитозановую матрицу и криогели на основе агарозы и коллагена) и указал возможные пути повышения эффективности их загрузки клетками. Так, увеличение содержания желатины в составе агарозного криогеля способно улучшить прикрепление МСК к этому материалу. Судя по результатам оценки прикрепления МСК к белкам внеклеточного матрикса in vitro, можно предположить, что стимулирующее влияние на адгезию этих клеток к носителям, возможно, окажет и иммобилизация на поверхности последних фибронектина. Впрочем, при этом нельзя сбрасывать со счетов и обнаруженное нами подавление остеогенной дифференцировки МСК при культивировании на фибронектине, а адипогенной – также и на коллагене. Влияние адгезивных взаимодействий с компонентами внеклеточного матрикса на МСК в различных экспериментальных условиях требует отдельного углубленного исследования, которое позволит не только прояснить роль этих взаимодействий в созревании и функционировании популяции МСК, но и дать ответ на вопрос о применимости тех или иных белков матрикса в тканеинженерных конструкциях.

Еще одним перспективным направлением дальнейшей работы представляется детальное изучение зависимости характеристик МСК различного происхождения от длительности их культивирования *in vitro*. Наш анализ роста, морфологии и фенотипа МСК был ограничен первыми 3-4 пассажами; в дальнейшем представляет интерес проследить динамику изменений свойств МСК, включая и их потенции к дифференцировке, на протяжении более продолжительного культивирования и сравнить, одинаков ли характер изменений, претерпеваемых клетками из разных органов и на разных стадиях онтогенеза.

Поскольку основная функция МСК в органах гемопоэза состоит в организации кроветворного микроокружения, несомненный интерес представляет также оценка способности создаваемой ими стромы к поддержанию кроветворения. В частности, возникает вопрос, специфична ли эта способность для стромы именно кроветворных органов. Имеющиеся в литературе данные не позволяют сделать однозначного заключения на этот счет. Так, с одной стороны, иммортализованные линии стромальных клеток легкого, почки или кожи,

морфологически и фенотипически сходные с полученными из костного мозга, отличаются от них неспособностью поддерживать пролиферацию СКК, хотя и связываются с последними [Rios, Williams, 1990], а МСК из жировой ткани поддерживают дифференцировку СКК, но не обеспечивают их длительного выживания и самоподдержания [Corre et al., 2006]. С другой стороны, сообщалось, что по способности поддерживать гемопоэз in vitro со стромальными клетками костного мозга человека сопоставимы MCK из пуповинной крови [Wagner et al., 2007] и толстого кишечника [Signore et al., 2012], а у облученных мышей после внутрибрюшинной трансплантации клеток костного мозга кровевторные очаги образуются не только в селезенке, но и в брыжейке [Umar, van Griensven, 1978]. Ранее нами был проведен сравнительный анализ кроветворной дифференцировки под влиянием стромальных клеток различного происхождения на модели образования очагов гемопоэза в перитонеальной полости облученных мышей после введения им донорских кроветворных клеток. Результаты исследования показали, что способность организовывать кроветворное микроокружение в этой системе не является специфической особенностью МСК из органов гемопоэза: кроветворные очаги образовывались на подслоях стромальных клеток не только костного мозга, селезенки и зародышевой печени, но и некроветворных тканей (в частности, кожи и почки) [Мичурина и др., 1999; Паюшина, 1999], а также фибробластов нескольких постоянных линий, в том числе полученных из подкожной соединительной ткани и легкого [Мичурина и др., 2002]. Однако следует иметь в виду, что данная экспериментальная модель позволяет оценивать влияние стромы лишь на пролиферацию и дифференцировку родоначальных кроветворных клеток, но не на самоподдержание СКК. Возможно, специфичность стромальной функции клеток из кроветворных органов проявляется в способности создавать нишу именно для этой, наиболее примитивной категории кроветворных клеток. В то же время регуляторное влияние на коммитированные кроветворные предшественники за счет продукции цитокинов могут иной органной локализации, а возможно, и фибробласты, не оказывать также и МСК обладающие свойствами МСК. Это предположение требует экспериментальной проверки с применением широкого спектра методических подходов. В частности, сокультивирование стромальных и кроветворных клеток in vitro в полутвердой среде и по методу Декстера позволит, с одной стороны, количественно оценить клональный рост и дифференцировку кроветворных клеток, а с другой – проанализировать самоподдержание СКК. Кроме того, при исследовании механизмов влияния МСК на гемопоэз ценные результаты могут дать молекулярно-генетический и иммуноферментный анализы экспрессии стромальными клетками кроветворных цитокинов на уровне соответственно мРНК и белка.

Комплексное сравнительное исследование МСК различной локализации в процессе индивидуального развития с точки зрения их способности поддерживать гемопоэз может стать

ценным дополнением к проведенному нами анализу, показавшему корреляцию фенотипических и функциональных характеристик этих клеток с активностью кроветворения. Для выяснения клеточных и молекулярных механизмов, лежащих в основе этой корреляции, также требуются дополнительные исследования. Наконец, представляет интерес сравнительный анализ свойств МСК из кроветворных и некроветворных органов, который мог бы прояснить вопрос о том, вносит ли участие МСК в поддержании гемопоэза какую-либо специфику в их фенотип и потенции к дифференцировке. Подобный анализ, охватывающий широкий спектр органов – источников МСК, планируется нами в качестве одного из направлений дальнейших исследований.

Факты, полученные в нашей работе, существенно расширяют представления о становлении популяции МСК в онтогенезе, об их биологии, о роли в развитии и обеспечении стабильной жизнедеятельности организма. Ее результаты дают новые знания о процессе формирования кроветворной ниши, указывая на то, что ее изменение вследствие созревания МСК может иметь определяющее влияние на приобретение дефинитивных свойств популяцией СКК. Кроме того, полученные данные открывают новые перспективы для применения МСК в регенеративной медицине.

выводы

В диссертации получены и проанализированы новые данные о процессе формирования дефинитивной популяции мезенхимных стромальных клеток (МСК) как ключевого компонента кроветворного микроокружения.

1. В кроветворных органах зародыша (печени, селезенке, кости с зачатком костного мозга), как и в зрелом костном мозге, выявлены клоногенные стромальные клетки с фенотипическими признаками, характерными для МСК. Впервые обнаружена корреляция динамики содержания этих клеток в печени и селезенке, а также присутствия на них антигенов CD73 и CD90, с кроветворной активностью органов на разных стадиях онтогенеза.

2. Первичная культура клеток печени зародышей отличается от таковой костного мозга более гетерогенным клеточным составом и содержит помимо фибробластов примесь миофибробластов, эпителиоцитов и миогенных предшественников, исчезающих в ходе пассирования.

3. В процессе пассирования стромальные клетки костного мозга, печени и селезенки сохраняют иммунофенотип, но постепенно снижают пролиферативную активность, причем клетки половозрелого организма по сравнению с таковыми зародыша характеризуются меньшей пролиферативной активностью и более ранним появлением признаков старения культуры.

4. Обнаружены межорганные различия в наборе и выраженности потенций МСК к дифференцировке. МСК селезенки и зародышевой печени отличаются от таковых из костного мозга меньшей способностью к остео-, адипо- и хондрогенезу. Выраженность потенций МСК из печени и селезенки к остео- и адипогенезу in vitro, а также потенций МСК из печени к хондрогенезу in vivo меняется в ходе развития, коррелируя с активностью гемопоэза.

5. Реализация потенций МСК к дифференцировке in vivo зависит не только от органной принадлежности клеток, но и от условий микроокружения. В составе тканевого фрагмента, трансплантированного в почку, МСК из печени зародышей дифференцируются в хондрогенном направлении, тогда как в диффузионных камерах со взвесью свежевыделенных клеток – в остеогенном. Некультивированные МСК костного мозга формируют в диффузионных камерах кость, хрящ и кроветворную строму. После выделения МСК в культуру их способность к последующей дифференцировке в диффузионных камерах сохраняется у клеток из костного мозга, но теряется у клеток из зародышевой печени.

6. МСК из зрелого костного мозга и зародышевой печени гетерогенны по чувствительности к 5-фторурацилу. Резистентные к нему клетки обоих органов имеют пониженный пролиферативный потенциал. В костном мозге они теряют остеогенные потенции

в ходе пассирования быстрее, а в печени зародыша – медленнее, чем чувствительные к 5фторурацилу клетки. Выявленные органотипические особенности в темпе изменения остеогенных потенций свидетельствуют о разном содержании зрелых клеток в устойчивых к 5фторурацилу субпопуляциях МСК.

7. Выявлены различия в адгезивных свойствах МСК зрелого костного мозга и зародышевой печени: последние более адгезивны к пластику и белкам внеклеточного матрикса. Культивирование МСК обоих органов на фибронектине или коллагене I типа по сравнению с пластиком не повышает число КОЕ-Ф, прикрепившихся за первые 7 суток, но снижает эффективность клонирования КОЕ-Ф, не прикрепившихся за этот срок. Впервые показано, что взаимодействие с фибронектином (через домен, связывающийся с клеткой) ослабляет остеогенные потенции МСК костного мозга. Коллаген I типа и в меньшей степени фибронектин подавляют их адипогенную дифференцировку.

На основании полученных результатов выдвинута концепция созревания кроветворной ниши в индивидуальном развитии организма путем приобретения МСК компетентности к дифференцировке в ее специализированные клеточные компоненты.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БСА	_	бычий сывороточный альбумин
Г-КСФ	-	гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
ГМ-КСФ	-	гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
ИЛ	_	интерлейкин
КОЕ-С	_	колониеобразующие единицы селезенки
КОЕ-Ф	_	колониеобразующие единицы фибробластов
М-КСФ	_	макрофагальный колониестимулирующий фактор
МСК	_	мезенхимные стромальные клетки
РТПХ	_	реакция «трансплантат против хозяина»
СКК	_	стволовые кроветворные клетки
5-ФУ	_	5-фторурацил
ЩФ	_	щелочная фосфатаза
ALBP	_	adipocyte lipid binding protein, белок адипоцитов, связывающий липиды
ALCAM	_	activated leukocyte adhesion molecule, молекула клеточной адгезии
		активированных лейкоцитов
BDNF	-	brain-derived neurotrophic factor, нейротрофический фактор мозга
BMP	_	bone morphogenetic proteins, костные морфогенетические белки
CAR-клетки	_	CXCL12-abundant reticular cells, ретикулярные клетки, богатые CXCL12
EGF	_	epidermal growth factor, эпидермальный фактор роста
bFGF	_	basic fibroblast growth factor, основной фактор роста фибробластов
GFAP	_	glial fibrillary acidic protein, глиальный фибриллярный кислый белок
HGF	_	hepatocyte growth factor, фактор роста гепатоцитов
IBMX	_	3-isobutyl-1-methylxanthine, 3-изобутил-1-метилксантин
ICAM-1	_	intercellular adhesion molecule-1, молекула межклеточной адгезии
IGF	_	insulin-like growth factors, инсулиноподобные факторы роста
LIF	_	leukemia inhibitory factor, лейкозингибирующий фактор
MAPC	_	multipotent adult progenitor cells, мультипотентные взрослые
		родоначальные клетки
MASC	_	multipotent adult stem cells, мультипотентные взрослые стволовые клетки
МСР	_	monocyte chemoattractant proteins, хемоаттрактантные белки для моноцитов
MIAMI-клетки	_	marrow-isolated adult multilineage inducible cell, выделенные из костного
		мозга взрослые мультипотентные индуцибельные клетки

Muse-клетки	_	multilineage-differentiating stress-enduring cells, устойчивые к стрессу		
		клетки, дифференцирующиеся во множественных направлениях		
N-CAM	_	neural cell adhesion molecule, молекула адгезии нервных клеток		
NGF	_	nerve growth factor, фактор роста нервов		
PDGF	_	platelet-derived growth factor, фактор роста из тромбоцитов		
PPAR-γ	_	peroxisome proliferator-activated receptor-у2, активируемый		
		пролифераторами пероксисомный рецептор-ү		
RS-клетки	_	rapidly self-renewing cells, быстро самообновляющиеся клетки		
SCF	_	stem cell factor, фактор стволовых клеток		
SDF-1	_	stromal-derived factor-1, фактор стромального происхождения-1		
SP	_	side population, побочная популяция		
SSEA	_	stage-specific embryonic antigen, стадиеспецифический эмбриональный		
		антиген		
TGFβ	_	transforming growth factor β , трансформирующий фактор роста β		
TNFα	_	tumor necrosis factor α, фактор некроза опухолей α		
TRAIL	_	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand), родственный		
		фактору некроза опухолей лиганд, индуцирующий апоптоз		
USSC	_	unrestricted somatic stem cells, неограниченные соматические стволовые		
		клетки		
VCAM-1	_	vascular cell adhesion molecule, молекула адгезии сосудистых клеток		
VEGF	_	vascular endothelial growth factor, фактор роста сосудистого эндотелия		
VSELs	_	very small embryonic-like stem cells, очень мелкие эмбрионально-подобные		
		стволовые клетки		

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анохина Е.Б., Буравкова Л.Б. Гетерогенность стромальных клеток-предшественников, выделенных из костного мозга крыс // Цитология. – 2007. – Т. 49. – № 1. –- С. 40-47.

2. Большаков И.Н., Горбунов Н.С., Шамова Е.С., Сетков Н.А., Еремеев А.В., Сизых А.Г., Сурков Е.В., Насибов С.М., Малый В.П. Раневое покрытие на основе коллаген-хитозанового комплекса. Патент РФ № 2254145, А61 L15/28, 15/32, 26/00 // БИПМ № 17 от 20.06.2005 (а).

3. Большаков И.Н., Кириченко А.К., Еремеев А.В., Власов А.А. Применение коллагенхитозанового раневого покрытия с культурой эмбриональных фибробластов при местном лечении глубоких ожогов // Фундаментальные исследования. – 2008. – № 10. – С. 59-60.

4. Большаков И.Н., Насибов С.М., Еремеев А.В., Малый В.П., Фрончек Э.В., Горбунов Н.С., Шамова Е.С., Сизых А.Г., Сурков Е.В., Сетков Н.А. Способ получения искусственной матрицы кожи. Патент РФ № 2252787, А61 L15/28, 15/32, 27/60 // БИПМ № 15 от 27.05.2005 (б).

5. Буеверова Э.И., Брагина Е.В., Молчанова Е.А. Неадгезивные популяции в культурах мезенхимных стромальных клеток из кроветворных органов крысы и мыши // Онтогенез. – 2008. – Т. 39. – № 6. – С. 420-429.

6. Буравкова Л.Б., Андреева Е.Р., Григорьев А.И. Роль кислорода как физиологического фактора в проявлении функциональных свойств мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека // Физиология человека. – 2012. – Т. 38. – № 4. С. 121-130.

7. Васильева И.А., Коноплянников А.Г., Ерохин В.В., Цыб А.Ф., Багдасарян Т.Р., Даниленко А.А., Лепехина Л.А., Кальсина С.Ш., Семенкова И.В., Агаева Е.В. Лечебный эффект системной трансплантации культивируемых аутогенных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга у больных с резистентными формами туберкулеза легких // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – Т. 2. – № 1. – С. 77-80.

 Владимирская Е.Б. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) в клеточной терапии // Онкогематология. – 2007. – № 1. – С. 4-16.

9. Горская Ю.Ф., Фриденштейн А.Я., Кулагина Н.Н. Клетки-предшественники фибробластов, выявляемые методом клонирования in vitro клеток кроветворных органов нормальных и облученных мышей // Бюлл. экспер. биол. – 1976. - № 5. – С. 614-617.

10. Гумерова А.А., Киясов А.П. Могут ли перисинусоидальные клетки быть региональными стволовыми (прогениторными) клетками печени? // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. 5. - № 1. – С. 33-40.

Домарацкая Е.И. Стволовые клетки-резиденты костного мозга // Известия РАН. Сер.
биол. – 2011. - № 3. – С. 1-12.

12. Домарацкая Е.И., Буеверова Э.И., Паюшина О.Д., Старостин В.И. Повреждение алкилирующим препаратом дипином кроветворных и стромальных клеток костного мозга // Известия РАН. Сер. биол. – 2005. – № 3. – С. 267-272.

13. Домарацкая Е.И., Старостин В.И., Прянишникова О.Д. Влияние 5-фторурацила на клоногенные кроветворные клетки (КОЕ-С) зародышей и половозрелых мышей // Известия РАН. Сер. биол. – 1995. - № 4. – С. 398-402.

14. Дроздова М.Г., Акасов Р.А., Зайцева-Зотова Д.С., Голунова А.С., Артюхов А.А., Прудченко И.А., Штильман М.И., Марквичева Е.А. Криогели на основе модифицированного поливинилового спирта для тканевой инженерии // Вестник биотехнологии и физикохимической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2011. – Т. 7. - № 4. – С. 27-28.

15. Заварзин А.А. О номенклатуре клеточных форм фибробластического ряда в связи с вопросом о ревизии теории мезенхимного резерва // Избранные труды / Заварзин А.А. – М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1953. – Т. 2. – С. 219-232.

16. Земелько В.И., Гринчук Т.М., Домнина А.П., Арцыбашева И.В., Зенин В.В., Кирсанов А.А., Бичевая К.Н., Корсак В.С., Никольский Н.Н. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека // Цитология. – 2011. – Т. 53. - № 12. – С. 919-929.

17. Каршиева С.Ш., Красикова Л.С., Белявский А.В. Мезенхимные стволовые клетки как средство противоопухолевой терапии // Молекулярная биология. – 2013. – Т. 47. - № 1. – С. 50-60.

18. Кейлис-Борок И.В., Лациник Н.В., Епихина С.Ю., Фриденштейн А.Я. Динамика формирования колоний фибробластов в монослойных культурах костного мозга по данным включения Н3-тимидина // Цитология. – 1971. – Т. 13. - № 11. – С. 1402-1409.

19. Киясов А.П., ван Еукен П., ван Пелт Е., Яп С.Х. Экспрессия десмина и цитокератинов № 8 и 18 в некроветворных клетках печени крыс // Онтогенез. – 1997. – Т. 28. -№ 3. – С. 217-222.

20. Кожевникова М.Н., Микаелян А.С., Паюшина О.В., Старостин В.И. Сравнительная характеристика мезенхимных стромальных клеток из костного мозга крысы на ранних и поздних этапах культивирования // Известия РАН. Серия биол. 2008 (а). № 2. С. 156-162.

21. Кожевникова М.Н., Микаелян А.С., Старостин В.И. Молекулярно-генетические основы регуляции остеогенной дифференцировки мезенхимных стромальных клеток // Известия РАН. Сер. биол. – 2008 (б). - № 3. – С. 261-271.

22. Кожевникова М.Н., Микаелян А.С., Старостин В.И. Молекулярно-генетический и иммунофенотипический анализ антигенного профиля, остеогенных и адипогенных потенций мезенхимных стромальных клеток из печени зародышей и костного мозга половозрелых крыс // Цитология. – 2009. – Т. 51. – № 6. – С. 526-538.

23. Кожевникова М.Н., Паюшина О.В., Микаелян А.С., Буторина Н.Н., Старостин В.И. Сравнительная характеристика антигенного профиля мезенхимных стромальных клеток из печени зародышей крысы на разных этапах онтогенеза in vitro // Научная программа и тезисы VII международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность» (28-29 октября 2010 г., Москва). – М., 2010. – С. 96-97.

24. Колесникова А.И., Кальсина С.Ш., Конопляников А.Г., Лепехина Л.А. Радиочувствительность клеток-предшественников гемопоэтической стромы при действии гамма-излучения 60 Со в разных условиях // Радиобиология. – 1992. – Т. 32. - Вып. 6. – С. 844-850.

25. Кругляков Н.В., Соколова И.Б., Некрасова Н.Н., Вийде С.В., Зарицкий А.Ю., Кислякова Т.В., Полынцев Д.Г. Репарация костной ткани с помощью мезенхимальных стволовых клеток // Цитология. – 2004. – Т. 46. - № 10. – С. 920-921.

26. Лазебник Л.Б., Князев О.В., Коноплянников А.Г., Парфенов А.И., Ручкина И.Н., Михайлова З.Ф., Царегородцева Т.М., Хомерики С.Г., Рогозина В.А., Гудкова Р.Б., Щербаков П.Л. Аллогенные мезенхимальные стромальные клетки в лечении больных язвенным колитом: два года наблюдения // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2010. - № 11. – С. 3-15.

Дебединская О.В., Горская Ю.Ф., Шуклина Е.Ю., Лациник Н.В., Нестеренко В.Г.
Возрастные изменения количества стромальных клеток-предшественников в костном мозге животных // Морфология. – 2004. – Т. 126. - № 6. – С. 46-49.

28. Лебединская О.В., Горская Ю.Ф., Шуклина Е.Ю., Лациник Н.В., Нестеренко В.Г. Анализ изменений количества стромальных клеток-предшественников в тимусе и селезенке животных различных возрастных групп // Морфология. – 2005. – Т. 127. - № 3. – С. 41-44.

29. Марквичева Е.А., Дроздова М.Г., Акасов Р.А., Зайцева-Зотова Д.С. Биосовместимые материалы в тканевой инженерии // Клеточные технологии для регенеративной медицины / под ред. Г.П. Пинаева, М.С. Богдановой, А.М. Кольцовой. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2011. – С. 103-126.

30. Маянская И.В., Гоганова А.Ю., Толкачева Н.И., Ашкинази В.И., Маянский А.Н. Иммуносупрессивное действие мезенхимальных стволовых (стромальных) клеток // Иммунология. – 2013. – Т. 34. - № 2. – С. 122-128.

31. Мичурина Т.В., Васильева Т.В., Буеверова Э.И., Сатдыкова Г.П., Паюшина О.В., Брагина Е.В., Никонова Т.М., Хрущов Н.Г. Экспериментальное исследование межклеточных взаимодействий при гемопоэзе // Онтогенез. – 1999. – Т. 30. – № 1. – С. 3-25.

32. Мичурина Т.В., Паюшина О.В., Буеверова Э.И., Сатдыкова Г.П., Брагина Е.В., Никонова Т.М., Хрущов Н.Г. Кроветворение на стромальных подслоях, образованных постоянными линиями фибробластов // Известия РАН. Сер. биол. – 2002. – № 4. – С. 393-401.

33. Модина Т.Н., Михайлова В.А., Богородская М.В., Болбат М.В., Маклакова И.С. Применение «Остеопласта» при хирургическом лечении пациентов с воспалительнодеструктивными заболеваниями пародонта // Клиническая стоматология. – 2008. - № 1. – С. 80-81.

34. Молчанова Е.А., Буеверова Э.И., Старостин В.И., Домарацкая Е.И. Чувствительность к действию факторов роста EGF, bFGF и PDGF субпопуляций мезенхимных стромальных клеток, происходящих из органов миелоидного кроветворения и отличающихся по времени проявления адгезивных свойств // Известия РАН. Сер. биол. – 2011. – № 2. – С. 133-144.

35. Молчанова Е.А., Паюшина О.В., Старостин В.И. Влияние факторов роста на мультипотентные мезенхимные стромальные клетки костного мозга // Известия РАН. Серия биол. 2008. № 6. С. 645-662.

36. Одинак М.М., Бисага Г.Н., Новицкий А.В., Тыренко В.В., Полынцев Д.Г., Кругляков П.В., Билибина А.А., Фоминых М.С. Аутологичная трансплантация мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток при боковом амиотрофическом склерозе и рассеянном склерозе // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2009. – Т. 3. – С. 38-42.

37. Осипова Е.Ю., Никитина В.А., Астрелина Т.А., Устюгов А.Ю., Дмитриева Е.В., Пурбуева Б.Б., Скоробогатова Е.В., Шаманская Т.В., Дышлевая З.М., Яковлева М.В., Майорова О.А., Катосова Л.Д., Румянцев С.А., Бочков Н.П. Динамика скорости роста, иммунофенотипа и генетическая стабильность мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека на ранних и поздних пассажах при культивировании ех vivo // Онкогематология. – 2009. - № 1. – С. 44-50.

38. Павлюченко В.Н., Иванчев С.С. Композиционные полимерные гидрогели // Высокомолекулярные соединения. Серия А. – 2009. – Т. 51. - № 7. – С. 1075-1095.

39. Панюхин Н.В., Вишнякова Х.С., Егоров Е.Е. Влияние парциального давления кислорода на выживаемость, пролиферацию и дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга мыши // Биологические мембраны. – 2008. – Т. 25. - № 5. – С. 352-359.

40. Паюшина О.В. Экспериментальное исследование взаимодействий кроветворных клеток с элементами стромы: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.11 — М., 1999. – 139 с.

41. Паюшина О.В., Буторина Н.Н., Никонова Т.М., Кожевникова М.Н., Шевелева О.Н., Старостин В.И. Сравнительное исследование клонального роста и дифференцировки мезенхимных стромальных клеток из печени зародышей крысы на разных сроках пренатального развития // Цитология. 2011. Т. 53. № 11. С. 859-867.

42. Паюшина О.В., Домарацкая Е.И., Буеверова Э.И., Никонова Т.М., Буторина Н.Н. Молчанова Е.А., Старостин В.И. Анализ чувствительности родоначальных клеток стромы (КОЕ-Ф) костного мозга и эмбриональной печени крысы к 5-фторурацилу // Известия РАН. Серия биол. 2006. № 6. С. 660-666.

43. Паюшина О.В., Хныкова О.Н., Буторина Н.Н., Кожевникова М.Н., Старостин В.И. Спонтанный миогенез в первичной культуре эмбриональной печени крысы // Доклады Академии наук. 2009. Т. 425. № 1. С. 120-122.

44. Петренко Ю.А., Волкова Н.А., Жуликова Е.П., Дамшкалн Л.Г., Лозинский В.И., Петренко А.Ю. Выбор условий заселения полимерных макропористых губок стромальными клетками костного мозга человека // Біополімери і клітина. – 2008. – Т. 24. - № 5. – С. 399-406. 45. Пирс Э. Гистохимия. – М.: Изд-во ин. лит-ры, 1962. – 962 с.

46. Рубцов Ю.П., Суздальцева Ю.Г., Горюнов К.В., Калинина Н.И., Сысоева В.Ю., Ткачук В.А. Регуляция иммунитета мультипотентными мезенхимными стромальными клетками // Acta Naturae. – 2012. Т. 4. - № 1. – С. 24-33.

47. Седов В.М., Вавилов В.Н., Зарицкий А.Ю., Сенчик И.Ю., Крутиков А.Н., Крылов А.В., Климович А.В., Лапина В.М., Полынцев Д.Г. Эффективность клеточной терапии у больных с критической ишемией нижних конечностей // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2011. – Т. 10. - № 2. – С. 45-52.

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

49. Старостин В.И. Улучшенный способ эктопической трансплантации целой селезенки у мышей // Онтогенез. – 1984. – Т. 15. – № 2. – С. 202-205.

50. Старостин В.И., Домарацкая Е.И. Хондро- и остеогенез в эктопических трансплантатах печени зародышей мышей // Онтогенез. – 2001. – Т. 32. - № 2. – С. 114-117.

51. Старостин В.И., Домарацкая Е.И., Буеверова Э.И., Брагина Е.В. Чувствительность к 5-фторурацилу кроветворной стромы костного мозга и селезенки // Известия РАН. Сер. биол. – 1995. – № 4. – С. 496-500.

52. Стрелков Р.Б. Таблицы Стрелкова и экспресс-метод статистической обработки данных. – М., ПАИМС, 1999. – 96 с.

53. Татаринова О.С., Осипова Е.Ю., Румянцев С.А. Биологические свойства и возможности клинического использования мезенхимальных стволовых клеток // Онкогематология. – 2009. - № 4. – С. 33-44.

54. Фриденштейн А.Я., Пятецкий-Шапиро И.И., Петракова К.В. Костеобразование в трансплантатах костномозговых клеток // Архив анатомии, гистол. и эмбриол. – 1969. – Т. 56. - № 3. – С. 3-11.

55. Фриденштейн А.Я., Чайлахян Р.К., Лалыкина К.С. О фибробластоподобных клетках в культурах кроветворной ткани морских свинок // Цитология. – 1970. – Т. 12. - № 9. – С. 1147-1155.
56. Хоптынская С.К., Колесникова А.И., Коноплянников А.Г., Павлов В.В., Байсоголов Г.Д. Радиочувствительность стромальных механоцитов костного мозга и селезенки человека // Мед. радиология. – 1984. – Т. 29. - № 6. – С. 21-24.

57. Чайлахян Р.К., Герасимов Ю.В. Стволовые стромальные клетки костного мозга: экспериментальные исследования и применение в клинике // Медицинская иммунология. – 2004. – Т. 6. - № 3-5. – С. 201-205.

58. Швед Ю.А. Создание трехмерных матриц для трехмерного культивирования клеток // Клеточные технологии для регенеративной медицины / под ред. Г.П. Пинаева, М.С. Богдановой, А.М. Кольцовой. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2011. – С. 127-144.

59. Шевелева О.Н., Паюшина О.В., Кожевникова М.Н., Буторина Н.Н., Старостин В.И. Спонтанный и индуцированный миогенез при культивировании клеток из печени зародышей крысы // Цитология. 2011. Т. 53. № 11. С. 874-883.

60. Шумаков В.И., Казаков Э.Н., Онищенко Н.А., Гуреев С.В., Остроумов Е.Н., Честухин В.В., Крашенинников М.Е., Миронков Б.Л., Хубутия А.Ш. Первый опыт клинического применения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга для восстановления сократительной функции миокарда // Российский кардиологический журнал. – 2003. - № 5. – С. 42-50.

61. Abdallah B.M., Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications // Gene Therapy. – 2008. – V. 15. – N 2. – P. 109-116.

62. Abedin M., Tintut Y., Demer L.L. Mesenchymal stem cells and the artery wall // Circ. Res. - 2004. - V. 95. - N 7. - P. 671-676.

63. Abramoff M.D., Magelhaes P.J., Ram S.J. Image processing with ImageJ // Biophoton. Int. – 2004. – V. 11. – P.36-42.

64. Ahdjoudj S., Kaabeche K., Holy X., Fromigue O., Modrowski D., Zerath E., Marie P.J. Transforming growth factor-beta inhibits CCAAT/enchancer-binding protein expression and PPAR gamma activity in unloaded bone marrow stromal cells // Exp. Cell Res. – 2005. – V. 303. – N 1. – P. 138-147.

65. Aiuti A., Cicchini C., Bernardini S., Fedele G., Amicone L., Fantoni A., Tripodi M. Hematopoietic support and cytokine expression of murine-stable hepatocyte cell lines (MMH) // Hepatology. – 1998. – V. 28. – N 6. – P.1645-1654.

66. Aizawa S., Yaguchi M., Nagasu M., Toyama K., Handa H. Hematopoietic supportive function of cloned human bone marrow derived stromal cells in vitro // Exp. Hematol. – 1992. – V. 20.
– N 6. – P. 811.

67. Aizawa S., Yaguchi M., Nakano M., Toyama K., Inokuchi S., Imai T., Yasuda M., Nabeshima R., Handa H. Hematopoietic supportive function of human bone marrow stromal cell lines established by a recombinant SV-40 - adenovirus vector // Exp. Hematol. – 1994. – V. 22. – N 6. – P.482-487.

68. Akimov S.S., Krylov D., Fleischman L.F., Belkin A.M. Tissue transglutaminase is an integrin-binding adhesion coreceptor for fibronectin // J. Cell Biol. – 2000. – V. 148. – N 4. – P. 825-838.

69. Alberton P., Popov C., Prägert M., Kohler J., Shukunami C., Schieker M., Docheva D. Conversion of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells into tendon progenitor cells by ectopic expression of scleraxis // Stem Cells Dev. – 2012. – V. 21. – N 6. – P. 846-858.

70. Allers C., Sierralta W.D., Neubauer S., Rivera F., Minguell J.J., Conget P.A. Dynamic of distribution of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells after transplantation into adult unconditioned mice // Transplantation. -2004. - V. 78. - N 4. - P. 503-508.

71. Altman G.H., Horan R.L., Martin I., Farhadi J., Stark P.R., Volloch V., Richmond J.C.,
Vunjak-Novakovic G., Kaplan D.L. Cell differentiation by mechanical stress // FASEB J. – 2002.– V.
16. – N 2. – P. 270-272.

72. Altman A.M., Matthias N., Yan Y., Song Y.-H., Bai X., Chiu E.S., Slakey D.P., Alt E.U. Dermal matrix as a carrier for in vivo delivery of human adipose-derived stem cells // Biomaterials. – 2008. – V. 29. – N 10. – P. 1431-1442.

73. Amenta P. S., Harrison D. Expression and potential role of the extracellular matrix in hepatic ontogenesis: a review // Microsc. Res. Tech. – 1997. – V. 39. – N 4. – P. 372-386.

74. Amstein C.F., Hartman P.A. Adaptation of plastic surfaces for tissue culture by glow discharge // J. Clin. Microbiol. – 1975. – V. 2. – N 1. – P. 46-54.

75. Angstmann M., Brinkmann I., Bieback K., Breitkreutz D., Maercker C. Monitoring human mesenchymal stromal cell differentiation by electrochemical impedance sensing // Cytotherapy. – 2011. – V. 13. – N 9. – P. 1074-1089.

76. Anjos-Afonso F., Bonnet D. Non-hematopoietic / endothelial SSEA-1 pos cells defines the most primitive progenitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment // Blood. – 2007. - V. 109. - N 3. - P. 1298-1306.

77. Anjos-Afonso F., Siapati E.K., Bonnet D. In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage condition // J. Cell Sci. – 2004. – V. 117. – Pt. 23. - P. 5655-5664.

78. in't Anker P.S., Noort W.A., Scherjon S.A., Kleijburg-van der Keur C., Kruisselbrink A.B., van Bezooijen R.L., Beekhuizen W., Willemze R., Kanhai H.H., Fibbe W.E. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential // Haematologica / Journal of hematology. – 2003. – V. 88. – N 8. – P. 845-852.

79. in't Anker P.S., Scherjon S.A., Kleijburg-van der Keur C., de Groot-Swings G.M., Claas F.H., Fibbe W.E., Kanhai H.H. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta // Stem Cells. – 2004. – V. 22. – N 7. – P. 1338-1345.

80. Ansari M., Strunk D., Schallomoser K., Delcó C., Rougemont A.L., Moll S., Villard J., Gumy-Pause F., Chalandon Y., Parvex P., Passweg J., Ozsahin H., Kindler V. Third-party mesenchymal stromal cell infusion is associated with a decrease in thrombotic microangiopathy symptoms observed post-hematopoietic stem cell transplantation // Pediatr. Transplant. – 1012. – V. 16. - N 2. - P. 131-136.

81. Antoon R., Yeger H., Loai Y., Islam S., Farhat W.A. Impact of bladder-derived acellular matrix, growth factors, and extracellular matrix constituents on the survival and multipotency of marrow-derived mesenchymal stem cells // J. Biomed. Mater. Res. A. -2012. - V. 100. - N 1. - P. 72-83.

82. Arkin S., Naparstek B., Guarini L., Ferrone S., Lipton J.M. Expression of intercellular adhesion molecule-1 CD54 on hematopoietic progenitors // Blood. – 1991. – V. 77. - N 5. – P. 948-953.

83. Ashton B.A., Allen T.D., Howlett C.R., Eaglesom C.C., Hattori A., Owen M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo // Clin. Orthop. Relat. Res. – 1980. – N 151. – P. 294-307.

84. Askmyr M., Sims N.A., Martin T.J., Purton L.E. What is the true nature of the osteoblastic hematopoietic stem cell niche? // Trends in Endocrinology and Metabolism. – 2009. – V. 20. – N 6. – P. 303-309.

85. Aslan H., Zilberman Y., Kandel L., Liebergall M., Oskouian R.J., Gazit D., Gazit Z. Osteogenic differentiation of noncultured immunoisolated bone marrow-derived CD105+ cells // Stem Cells. - 2006. - V. 24. - N 7. - P. 1728-1737.

86. Asumda F.Z., Chase P.B. Age-related changes in rat bone-marrow mesenchymal stem cell plasticity // BMC Cell Biology. – 2011. – V. 12. – P. 44. – doi: 10.1186/1471-2121-12-44.

87. Athanassiou G., Deligianni D. Adhesion strength of individual human bone marrow cells to fibronectin. Integrin beta1-mediated adhesion // J. Mater. Sci. Mater. Med. // 2001. – V. 12. – N 10-12. – P. 965-970.

88. Atmani H., Chappard D., Basle M.F. Proliferation and differentiation of osteoblasts and adipocytes in rat bone marrow stromal cell cultures: Effects of dexamethasone and calcitriol // J. Cell Biochem. – 2003. – V. 89. – N 2. – P. 364-372.

89. Aubin J. E., Liu F. The osteoblast lineage // Principles of bone biology / Eds. Bilezikian J.P., Raisz L. G., Rodan G. A. – San Diego: Academic Press, 1996. – P. 51-68.

90. Augello A., Kurth T.B., De Bari C. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches // Eur. Cells and Materials. -2010. - V. 20. - P. 121-133.

91. Aung A., Gupta G., Majid G., Varghese S. Osteoarthritic chondrocyte-secreted morphogens induce chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells // Arthritis Rheum. – 2011. – V. 63. – N 1. – P. 148-158.

92. Aung T., Miyoshi H., Tun T., Ohshima N. Chondroinduction of mouse mesenchymal stem cells in three-dimensional highly porous matrix scaffolds // J. Biomed. Mater. Res. – 2002. – V. 61. – N 1. – P. 75-82.

93. Axelrod D., Ravdin P., Koppel D.E., Schleissinger J., Webb W., Elson E.L., Podleski T.R. Lateral motion of fluorescently labeled acetylcholine receptors in membranes of developing muscle fibers // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1976. – V. 73. – N 12. – P. 4594-4598.

94. Ayres-Silva J.D., Manso P.P., Madeira M.R., Pelajo-Machado M., Lenzi H.L. Sequential morphological characteristics of murine fetal liver hematopoietic microenvironment in Swiss Webster mice // Cell Tissue Res. – 2011. – V. 344. – N 3. – P. 455-469.

95. Bab I., Ashton B.A., Gazit D., Marx G., Williamson M.C., Owen M. Kinetics and differentiation of marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo // J. Cell Sci. – 1986. – V. 84. – P. 139-151.

96. Badiavas E.V., Falanga V. Treatment of chronic wounds with bone marrow-derived cells // Arch. Dematol. – 2003. – V. 139. – N 4. – P. 510-516.

97. Badillo A.T., Redden R.A., Zhang L., Doolin E.J., Liechty K.W. Treatment of diabetic wounds with fetal murine mesenchymal stromal cells enhances wound closure // Cell Tissue Res. – 2007. – V. 329. - N 2. – P. 301-311.

98. Bae K.S., Park J.B., Kim H.S., Kim D.S., Park D.J., Kang S.J. Neuron-like differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells // Yonsei Med. J. – 2011. – V. 52. – N 3. – P. 401-412.

99. Baertschiger R.M., Serre-Beinier V., Morel P., Bosco D., Peyrou M., Clement S., Sgroi A., Kaelin A., Buhler L.H., Gonelle-Gispert C. Fibrogenic potential of human multipotent mesenchymal stromal cells in injured liver // PLoS One. – 2009. – V. 4. – N 8. – e6657. – doi: 10.1371/journal.pone.0006657.

100. Baglio S.R., Pegtel D.M., Baldini N. Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy // Frontiers in Physiology. – 2012. – V. 3. – Article 359. – doi: 10.3389/fphys.2012.00359.

101. von Bahr L., Sundberg B., Lönnies L., Sander B., Karbach H., Hägglund H., Ljungman P., Gustafsson B., Karlsson H., LeBlanc K., Ringdén O. Long-term complication, immunologic effects, and role of passage for outcome in mesenchymal stromal cell therapy // Biol. Blood Bone Marrow Transplant. – 2012. – V. 18. – N 4. – P. 557-564.

102. Bains W., Ponte P., Blau H., Kedes L. Cardiac actin is the major actin gene product in skeletal muscle cell differentiation in vitro // Mol. Cell. Biol. – 1984. – V. 4. – N 8. – P. 1449-1453.

103. Baksh D., Davies J.E., Zandstra P.W.Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion // Exp. Hematol. – 2003. – V. 31. – N 8. – P. 723-732.

104. Baksh D., Davies J.E., Zandstra P.W. Soluble factor cross-talk between human bone marrow-derived hematopoietic and mesenchymal cells enhances in vitro CFU-F and CFU-O growth and reveals heterogeneity in the mesenchymal progenitor cell compartment // Blood. - 2005. - V. 106. - N 9. - P. 3012-3019.

105. Baksh D., Song L., Tuan R.S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy // J. Cell. Mol. Med. -2004. - V. 8. - N 3. - P. 301-316.

106. Balana A., Nicoletti C., Zahanich I., Graf E.M., Christ T., Boxberger S., Ravens U. 5-Azacytidine induces changes in electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells // Cell Res. – 2006. – V. 16. – N 12. – P. 949-960.

107. Ball S.G., Shuttleworth A.C., Kielty C.M. Direct cell contact influences bone marrow mesenchymal stem cell fate // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2004. – V. 36. – N 4. – P. 714-727.

108. Banfi A., Muraglia A., Dozin B., Mastrogiacomo M., Cancedda R., Quarto R. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy // Exp. Hematol. – 2000. – V. 28. – N 6. – P. 707-715.

109. Banfi A., Bianchi G., Notaro R., Luzzatto L., Cancedda R., Quarto R. Replicative aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells // Tissue Eng. – 2002. – V. 8. – N 6. – P. 901-910.

110. Bang O.Y., Lee P.H., Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients // Ann. Neurol. – 2005. – V. 57. – N 6. – P. 874-882.

111. Baraniak P.R., McDevitt T.C. Scaffold-free culture of mesenchymal stem cell spheroids in suspension preserves multilineage potential // Cell Tissue Res. – 2012. – V. 347. – N 3. – P. 701-711.

112. De Bari C., Dell'Accio F., Tylzanowski P., Luyten F.P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult synovial membrane // Arthritis Rheum. – 2001. – V. 44. – N 8. – P. 1928-1942.

113. Battula V.L., Treml S., Bareiss P.M., Gieseke F., Roelofs H., de Zwzrt P., Müller I., Schewe B., Skutella T., Fibbe W.E., Kanz L., Bühring H.-J. Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1 (MSCA-1) // Haematologica. – 2009. – V. 94. – N 2. – P. 173-184.

114. Baxter M.A., Wynn R.F., Jowitt S.N., Wraith J.E., Fairbairn L.J., Bellantuono I. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion // Stem Cells. – 2004. – V. 22. – N 5. – P. 675-682.

115. Bellows C.G., Aubin J.E., Heersche J.N.M., Antosz M.E. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations // Calcific. Tisue Int. – 1986. – V. 38. – N 3. – P. 143-154.

116. Bellows C.G., Pei W., Jia Y., Heersche J.N. Proliferation, differentiation and self-renewal of osteoprogenitors in vertebral cell populations from aged and young female rats // Mech. Ageing Dev. – 2003. – V. 124. – N 6. – P. 747-757.

117. Beltrami A.P., Cesselli D., Bergamin N., Marcon P., Rigo S., Puppato E., A'Aurizio F., Verardo R., Piazza S., Pignatelli A., Poz A., Baccarani U., Damiani D., Fanin R., Mariuzzi L., Finato N., Masolini P., Burelli S., Belluzzi O., Schneider C., Beltrami C.A. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow) // Blood. – 2007. – V. 110. – N 9. – P. 3438-3446.

118. Ben-Ishay Z., Prindull G., Sharon S., Borenstein A. Pre-CFU-f: young-type stromal stem cells in murine bone marrow following administration of DNA inhibitors // Int. KJ. Cell Cloning. – 1986. – V. 4. – N 2. – P. 126-134.

119. Ben-Ishay Z., Sharon S. Macrophages and / or fibroblasts in hematopoietic diffusion chamber cultures // Isr. J. Med. Sci. – 1977. – V. 13. – N 4. – P. 385-393.

120. Benavente C.A., Sierralta W.D., Conget P.A., Minguell J.J. Subcellular distribution and mitogenic effect of basic fibroblast growth factor in mesenchymal uncommitted stem cells // Growth Factors. -2003. - V. 21. - N 2. - P. 87-94.

121. Benayahu D., Akavia U.D., Shur I. Differentiation of bone marrow stroma-derived mesenchymal cells // Curr. Med. Chem. – 2007. – V. 14. N 2. – P. 173-179.

122. Bennett J.H., Joyner C.J., Triffitt J.T., Owen M.E. Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential // J. Cell Sci. – 1991. – V. 99. – Pt 1. – P. 131-139.

123. Bensidhoum M., Chapel A., Francois S., Demarquay C., Mazurier C., Fouillard L., Bouchet S., Bertho J.M., Gourmelon P., Aigueperse J., Charbord P., Gorin N.C., Thierry D., Lopez M. Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment // Blood. – 2004. – V. 103. – N 9. – P. 3313-3319.

124. Bernardo M.E., Emons J.A., KarperienM., Nauta A.J., Willemze R., Roelofs H., Romeo S., Marchini A., Rappold G.A., Vukicevic S., Locatelli F., Fibbe W.E. Human mesenchymal stem cells derived from bone marrow display a better chondrogenic differentiation compared with other sources // Connect. TissueRes. – 2007. – V. 48. – N 3. – P. 132-140.

125. Bhat S., Kumar A. Cell proliferation on three-dimensional chitosan-agarose-gelatin ctyogel scaffolds for tissue engineering applications // J. Biosci. Bioeng. – 1012. – V. 114. – N 6. – P. 663-670.

126. Bianchi G., Banfi A., Mastrogiacomo M., Notaro R., Luzzatto L., Cancedda R., Quarto R.
Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2 // Exp. Cell Res. –
2003. – V. 287. – N 1. – P. 98-105.

127. Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Robey P.G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications // Stem Cells. – 2001. – V. 19. – N 3. – P. 180-192.

128. Bieback K., Kern S., Kluter H., Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood // Stem Cells. – 2004. –V. 22. – N 4. – P. 625-634.

129. Bivalacqua T.J., Deng W., Kendirci M., Usta M.F., Robinson C., Taylor B.K., Murthy S.N., Champion H.C., Hellstrom W., Kadowitz P.J. Mesenchymal stem cells alone or ex vivo genemodified with endothelial nitric oxide synthase reverse age-associated erectile dysfunction // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2007. – V. 292. – N 3. – P. H1278-H1290.

130. Boeuf S., Richter W. Chondrogenesis of mesenchymal stem cells: role of tissue source and inducing factors // Stem Cell Res. Ther. -2010. - V. 1. - N 4. - P. 31. - doi: 10.1186/scrt31.

131. Bölgen N., Yang Y., Korkusuz P., Güzel E., El Hay A.J., Piskin E. 3D ingrowth of bovine articular chondrocytes in biodegradable cryogel scaffolds for cartilage tissue engineering // J. Tissue Eng. Regen. Med. – 2011. – V. 5. – N 10. – P. 770-779.

132. Bonab M.M., Alimoghaddam K., Talebian F., Ghaffari S.H., Ghavamzadeh A., Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro // BMC Cell Biol. – 2006. – V. 7. – P. 14.

133. Boomsma R.A., Geenen D.L. Mesenchymal stem cells secrete multiple cytokines that promote angiogenesis and have contrasting effects on chemotaxis and apoptosis // PLoS One. – 1012. – V. 7. – N 4. – P. e35685. – doi: 10.1371/journal.pone.0035685.

134. Bornstein R., Macias M.I., de la Torre P., Grande J., Flores A.I. Human deciduas-derived mesenchymal stromal cells differentiate into hepatic-like cells and form functional three-dimensional structures // Cytotherapy. – 2012. – V. 14. – N 10. – P. 1182-1192.

135. Bosnakovski D., Mizuno M., Kim G., Takagi S., Okumura M., Fujinaga T. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells // Cell Tissue Res. – 2005. – V. 319. – N 2. – P. 243-253.

136. Boxall S.A., Jones E. Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells // Stem Cells International. – 2012. – V. 2012. – doi: 10.1155/2012/975871.

137. Brockbank K.G., Ploemacher R.E., van Peer C.M. An in vitro analysis of murine hemopoietic fibroblastoid progenitors and fibroblastoid cell function during aging // Mech. Ageing Dev. -1983. - V. 22. - N 1. - P. 11-21.

138. Bruder S.P., Jaiswal N., Haynesworth S.E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation // J. Cell. Biochem. – 1997. – V. 64. – N 2. – P. 278-294.

139. Bruder S.P., Ricalton N.S., Boynton R.E., Connolly T.J., Jaiswal N., Zaia J., Barry F.P. Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation // J. Bone Miner. Res. – 1998. V. 13. – N 4. – P. 655-663.

140. Bruno S., Grange C., Collino F., Deregibus M.C., Cantaluppi V., Biancone L., Tetta C., Camussi G. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells enhance survival in a lethal model of acute kidney injury // PloS One. – 2012. – V. 7. – N 3. – P. e33115. – doi: 10.1371/journal.pone.0033115.

141. Bryson-Richardson R.J., Currie P.D. The genetics of vertebrate myogenesis // Nat. Rev. Genet. – 2008. –V. 9. – N 8. – P. 632-646.

142. Bui K.C., Senadheera D., Wang X., Hendrickson B., Friedlich P., Lutzko C. Recovery of multipotent progenitors from the peripheral blood of patients requiring extracorporeal membrane oxygenation support // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2010. – V. 181. – N 3. – P. 226-237.

143. Burg K.J.L., Holder W.D.Jr., Culberson C.R., Beiler R.J., Greene K.G., Loebsack A.B., Roland W.D., Eiselt P., Mooney D.J., Halberstadt C.R. Comparative study of seeding methods for three-dimensional polymeric scaffolds // J. Biomed. Mater. Re. – 2000. – V. 51. – N 4. – P. 642-649.

144. Burkin D.J., Kaufman S.J. The alpha7 beta1 integrin in muscle development and disease // Cell Tissue Res. – 1999. – V. 296. – N 1. – P. 183-190.

145. Burlacu A. Can 5-azacytidine convert the adult stem cells into cardiomyocytes? A brief overview // Arch. Physiol. Biochem. – 2006. – V. 112. – N 4. – P. 260-264.

146. van Buul G.M., Villafuertes E., Bos P.K., Waarsing J.H., Kops N., Narcisi R., Weinans H., Verhaar J.A., Bernsen M.R., van Osch G.J. Mesenchymal stem cells secrete factors that inhibit inflammatory processes in short-term osteoarthritic synovium and cartilage explant culture // Osteoarthritis Cartilage. – 2012. – V. 20. – N 10. – P. 1186-1196.

147. Cain C.J., Manilay J.O. Hematopoietic stem cell fate decisions are regulated by Wnt antagonists: comparisons and current controversies // Exp. Hematol. -2013. -V. 41. -N 1. -P. 3-16.

148. Campagnoli C., Roberts A.G., Kumar S., Bennett P.R., Bellantuono I., Fisk N.M. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow // Blood. – 2001. – V. 98. – N 8. – P. 2396-2402.

149. Campbell A.D., Long M.W., Wicha M.S. Developmental regulation of granulocytic cell binding to hemonectin // Blood. – 1990. – V. 76. - N 9. – P. 1758-1764.

150. Campioni D., Lanza F., Moretti S., Dominici M., Punturieri M., Pauli S., Hofmann T., Horwitz E., Castoldi G.L. Functional and immunophenotypic characteristics of isolated CD105(+) and fibroblast(+) stromal cells from AML: implications for their plasticity along endothelial lineage // Cytotherapy. -2003. - V. 5. - N 1. - P. 66-79.

151. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells // J. Orthop. Res. – 1991. – V. 9. – N 5. – P. 641-650.

152. Caplan A. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine // J. Cell. Physiol. – 2007. – V. 213. – N 2. – P. 341-347.

153. Caplan A.I. All MSCs are pericytes? // Cell Stem Cell. – 2008. – V. 3. – N 3. – P. 229-230.

154. Caplan A.I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight // J. Pathol. – 2009. – V. 217. – N 2. – P. 318-324.

155. Case N., Thomas J., Xie Z., Sen B., Styner M., Rowe D., Rubin J. Mechanical input restrains PPAR γ 2 expression and axtion to preserve mesenchymal stem cells multipotentiality // Bone. - 2013. - V. 52. - N 1. - P. 454-464.

156. Ceccaldi C., Fullana S.G., Alfarano C., Lairez O., Calise D., Cussac D., Parini A., Sallerin
B. Alginate scaffolds for mesenchymal stem cell cardiac therapy: influence of alginate composition //
Cell Transplant. – 2012. – V. 21. – N 9. – P. 1969-1984.

157. Chagraoui J., Lepage-Nolt A., Anjo A., Uzan G., Charbord P. Fetal liver stroma consists of cells in epithelial-to-mesenchymal transition // Blood. – 2003. – V. 101. – N 8. – P. 2973-2982.

158. Chamberlain G., Fox J., Ashton B., Middleton J. Mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features and potentioa for homing // Stem Cells. – 2007. – V. 25. – N 11. – P. 2739-2749.

159. Chan J., O'Donoghue K., Gavina M., Torrente Y., Kennea N., Mehmet H., Stewart H., Watt D.J., Morgan J.E., Fisk N.M. Galectin-1 induces skeletal muscle differentiation in human fetal

mesenchymal stem cells and increases muscle regeneration // Stem Cells. – 2006. – V. 24. – N 8. – P. 1879-1891.

160. Chang C.P., Chio C.C., Cheong C.U., Chao C.M., Cheng B.C., Lin M.T. Hypoxic preconditioning enhances the therapeutic potential of the secretome from cultured human mesenchymal stem cells in experimental traumatic brain injury // Clin. Sci. (Lond.). – 2013 (a). – V. 124. – N 3. – P. 165-176.

161. Chang P., Qu Y., Liu Y., Cui S., Zhu D., Wang H., Jin X. Multi-therapeutic effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells on radiation-induced intestinal injury // Cell Death Dis. – 2013 (b). – V. 4. – P. e685. – doi: 10.1038/cddis.2013.178.

162. Chapel A., Bertho J.M., Bensidhoum M., Fouillard L., Young R.G., Frick J., Demarquay C., Cuvelier F., Mathieu E., Trompier F., Dudoignon N., Germain C., Mazurier C., Aigueperse J., Borneman J., Gorin N.C., Gourmelon P., Thierry D. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome // J. Gene Med. – 2003. – V. 5. – N 12. – P. 1028-1038.

163. Charbord P., Oostendorp R., Pang W., Herault O., Noel F., Tsuji T., Dzierzak E., Peault B. Comparative study of stromal cell lines derived from embryonic, fetal and postnatal mouse blood-forming tissues // Exp. Hematol. – 2002. – V. 30. – N 10. – P. 1202-1210.

164. Charbord P., Remy-Martin J.P., Tamayo E., Bernard G., Keating A., Péault B. Analysis of the microenvironment necessary for engraftment: role of the vascular smooth muscle-like stromal cells // J. Hematother. Stem Cell Res. – 2000. – V. 9. – N 6. – P. 935-943.

165. Chase L.G., Yang S., Zachar V., Yang Z., Lakshmipathy U., Bradford J., Boucher S.E., Vemuri M.C. Development and characterization of a clinically compliant xeno-free culture medium in good manufacturing practice for human multipotent mesenchymal stem cells // Stem Cells Transl. Med. – 2012. – V. 1. – N 10. – P. 750-758.

166. Chasis J.A., Mohandas N. Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis // Blood. – 2008. – V. 112. – N 3. – P. 470-478.

167. Chastain S.R., Kundu A.K., Dhar S., Calvert J.W., Putnam A/J/ Adhesion of mesenchymal stem cells to polymer scaffolds occurs via distinct ECM ligands and controls their osteogenic differentiation // J. Biomed. Mater. Res. A. -2006. - V.78. - N1. - P.73-85.

168. Chaudhary L.R., Hofmeister A.M., Hruska K.A. Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation // Bone. – 2004. – V. 34. – N 3. – P. 402-411.

169. Chen J.-L., Hunt P., McElvain M., Black T., Kaufman S., Choi E.S.-H. Osteoblast precursor cells are found in CD34+ cells from human bone marrow // Stem Cells. – 1997. – V. 15. – N 5. – P. 368-377.

170. Chen J., Sotome S., Wang J., Orii H., Uemura T., Shinomiya K. Correlation of in vivo bone formation capability and in vitro differentiation of human bone marrow stromal cells // J. Med. Dent. Sci. -2005. - V.52. - N.1. - P.27-34.

171. Chen L.B., Jiang X.B., Yang L. Differentiation of marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells // World J. Gastroenterol. – 2004 (a). – V. 10. – N 20. – P. 3016-3020.

172. Chen S.L., Fang W.W., Qian J., Ye F., Liu Y.H., Shan S.J., Zhang J.J., Lin S., Liao L.M.,
Zhao R.C. Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction // Chin. Med. J. (Engl.). – 2004
(b). – V. 117. – N 10. – P. 1443-1448.

173. Chen S., Liu Z., Tian N., Zhang J., Yei F., Duan B., Zhu Z., Lin S., Kwan T.W. Intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells for ischemic cardiomyopathy due to isolated chronic occluded left anterior descending artery // J. Invasive Cardiol. -2006. - V. 18. - N 11. - P. 552-556.

174. Chen X.-D., Dusevich V., Feng J.Q., Manolagas S.C., Jilka R.L. Extracellular matrix made by bone marrow cells facilitates expansion of marrow-derived mesenchymal progenitor cells and prevents their differentiation into osteoblasts // 2007. – J. Bone Miner. Res. – V. 22. N 12. – P. 1943-1956.

175. Cherqui S., Kurian S.M., Schussler O., Hewel J.A., Yates III J.R., Salomon D.R. Isolation and angiogenesis by endothelial progenitors in the fetal liver // Stem Cells. – 2006. – V. 24. – N 1. – P. 44-54.

176. Chhabra A., Lechner A.J., Ueno M., Acharya A., Van Handel B., Wang Y., Iruela-Arispe M.L., Tallquist M.D., Mikkola H.K. Trophoblasts regulate the placental hematopoietic niche through PDGF-B signaling // Dev. Cell. – 2012. – V. 22. – N 3. – P. 651-659.

177. Chien C.-C., Yen B.L., Lee F.-K., Lai T.-H., Chen Y.-C., Chan S.-H., Huang H.-I. In vitro differentiation of human placenta-derived multipotent cells into hepatocyte-like cells // Stem Cells. – 2006. – V. 24. – N 7. – P. 1759-1768.

178. Chitteti B.R., Cheng Y.-H., Poteat B., Rodriguez- Rodriguez S., Goebel W.S., Carlesso N., Kacena M.A., Srour E.F. Impact of interactions of cellular components of the bone marrow

microenvironment on hematopoietic stem and progenitor cell function // Blood. – 2010. – V. 115. – N 16. – P. 3239-3248.

179. Chiu L.H., Yeh T.S., Huang H.M., Leu S.J., Yang C.B., Tsai Y.H. Diverse effects of type II collagen on osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells // J. Cell. Physiol. – 2012. – V. 227. – N 6. – P. 2412-2420.

180. Cho K.J., Trzaska K.A., Greco S.J., McArdle J., Wang F.S., Ye J.H., Rameshwar P. Neurons derived from human mesenchymal stem cells show synaptic transmission and can be induced to produce the neurotransmitter substance P by interleukin-1 {alpha} // Stem Cells. – 2005. – V. 23. – N 3. – P. 383-391.

181. Choi J.J., Yoo S.A., Park S.J., Kang Y.J., Kim W.U., Oh I.H., Cho C.S. Mesenchymal stem cells overexpressing interleukin-10 attenuate collagen-induced arthritis in mice // Clin. Exp. Immunol. – 2008. – V. 153. – N 2. – P. 269-276.

182. Chou S., Lodish H.F. Fetal liver hepatic progenitors are supportive stromal cells for hematopoietic stem cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2010. – V. 107. – N 17. – P. 7799-7804.

183. Chu Q., Wang Y., Fu X., Zhang S. Mechanism of in vitro differentiation of bone marrow stromal cells into neuron-like cells // Journal of Huazhong University of Science and Technology. – 2004. – V. 24. – N 3. – P. 259-261.

184. Chung C., Burdick J.A. Influence of three-dimensional hyaluronic acid microenvironment on mesenchymal stem cell chondrogenesis // Tissue Eng. Part A. – 2009. – V. 15. – N 2. – P. 243-254.

185. Chunmeng S., Tianmin C. Effects of plastic-adherent dermal multipotent cells on peripheral blood leukocytes and CFU-GM in rats // Transplant. Proc. – 2004. – V. 36. – N 5. – P. 1578-1581.

186. Coelho M.J., Fernandes M.H. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part
II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation //
Biomaterials. – 2000. – V. 21. – N 11. – P. 1095-1102.

187. Colter D.C., Class R., DiGirolamo C.M., Prockop D.J. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2000. – V. 97. – N 7. – P. 3213-3218.

188. Colter D.C., Sekiya I., Prockop D.J. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. -2001. - V. 98. - N 14. - P. 7841-7845.

189. Conget P.A., Allers C., Minguell J.J. Identification of a discrete population of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells exhibiting properties of uncommitted progenitors // J. Hematother. Stem Cell Res. -2001. - V. 10. - N. 6. - P. 749-758.

190. Conget P.A., Minguell J.J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells // J. Cell. Physiol. – 1999. – V. 181. – N 1. – P. 67-73.

191. Conget P., Rodriguez F., Kramer S., Allers C., Simon V., Palisson F., Gonzalez S., Yubero M.J. Replenishment of type VII collagen and re-epithelization of chronically ulcerated skin after intradermal administration of allogenic mesenchymal stromal cells in two patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa // Cytotherapy. – 2010. – V. 12. – N 3. – P. 429-431.

192. O'Connor K.C., Song H., Rosenzweig N., Jansen D.A. Extracellular matrix substrata alter adipocyte yield and lipogenesis in primary cultures of stromal-vascular cells from human adipose // Biotech. Lett. – 2003. – V. 25. – N 23. – P. 1967-1972.

193. Cool S.M., Nurcombe V. Substrate induction of osteogenesis from marrow-derived mesenchymal precursors // Stem Cells Dev. – 2005. – V. 14. – N 6. – P.632-642.

194. Corlu A., Lamy I., Ilyin G.P., Fardel O., Kneip B., Le Jossic C., Guguen-Guillouzo C. Hematopoiesis-promoting activity of rat liver biliary epithelial cells: involvement of a cell surface molecule, liver-regulating protein // Exp. Hematol. – 1998. – V. 26. – N 5. – P. 382-394.

195. Corre J., Barreau C., Cousin B., Chavoin J.-P., Caton D., Fournial G., Penicaud L., Casteilla L., Laharrague P. Human subcutaneous adipose cells support complete differentiation but not self-renewal of hematopoietic progenitors // J. Cell. Physiol. – 2006. – V. 208. – N 2. – P. 282-288.

196. Corselli M., Chen C.-W., Crisan M., Lazzari L., Péault B. Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2010. – V. 30. – N 6. – P. 1104-1109.

197. Coşkun S., Chao H., Vasavada H., Heydari K., Gonzales N., Zhou X., de Crombrugghe B., Hirschi K.K. Development of the fetal bone marrow niche and regulation of HSC quiescence and homing ability by emerging osteolineage cells // Cell Rep. – 2014. – V. 9. – N 2. – P.581-590.

198. Covas D.T., Panepucci R.A., Fontes A.M., Silva W.A., Jr., Orellana M.D., Freitas M.C.C., Neder L., Santos A.R.D., Peres L.C., Jamur M.C., Zago M.A. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts // Exp. Hematol. – 2008. – V. 36. – N 5. – P. 642-654.

199. Cristino S., Grassi F., Toneguzzi S., Piacentini A., Grigolo B., Santi S., Riccio M., Tognana E., Facchini A., Lisignoli G. Analysis of mesenchymal stem cells grown on a threedimensional HYAFF 11 (R) – based prototype ligament scaffold // J. Biomed. Mater. Res. A. – 2005. – V. 73. – N 3. – P. 275-283.

200. de Crombrugghe B., Lefebvre V., Behringer R.R., Bi W., Murakami S., Huang W. Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation // Matrix Biol. – 2000. – V. 19. – N 5. – P. 389-394.

201. Cronin K.J., Messina A., Thompson E.W., Morrison W.A., Stevens G.W., Knight K.R. The role of biological extracellular matrix scaffolds in vascularized three-dimensional tissue growth in vivo // J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. -2007. - V. 82. - N 1. - P. 122-128.

202. Cui Q., Wang G.J., Balian G. Pluripotential marrow cells produce adipocytes when transplanted into steroid-treated mice // Connect. Tissue Res. -2000. - V.41. - N1. - P.45-56.

203. Curley G.F., Hayes M., Ansari B., Shaw G., Ryan A., Barry F., O'Brien T., O'Toole D., Laffey J.G. Mesenchymal stem cells enhance recovery and repair following ventilator-induced lung injury in the rat // Thorax. – 2012. – V. 67. – N 6. – P. 496-501.

204. Curtis A.S., Forrester J.V., McInnes C., Lawrie F. Adhesion of cells to polystyrene surfaces // J. Cell Biol. – 1983. – V. 97. – N 5. - Pt 1. – P. 1500-1506.

205. Dalton B.A., McFarland C.D., Underwood P.A., Steele J.G. Role of the heparin binding domain of fibronectin in attachment and spreading of human bone-derived cells // J. Cell Sci. – 1995. – V. 108. – Pt 5. – P. 2083-2092.

206. Dan Y.Y., Riehle K.J., Lazaro C., Teoh N., Hague J., Campbell J.S., Fausto N. Isolation of multipotent progenitor cells from human fetal liver capable of differentiating into liver and mesenchymal lineages // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – V. 103. – N 26. – P. 9912-9917.

207. Danova-Alt R., Heider A., Egger D., Cross M., Alt R. Very small embryonic-like stem cells purified from umbilical cord blood lack stem cell characteristics // PLoS One. – 2012. – V. 7. – N 4. – P. e34899. – doi: 10.1371/journal.pone.0034899.

208. Davatchi F., Abdollahi B.G., Mohyeddin M., Shahram F., Nikbin B. Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis // Int. J. Rheum. Dis. – 2011. – V. 14. – N 2. – P. 211-215.

209. Day R.M., Boccaccini A.R., Maquet V., Shurey S., Forbes A., Gabe S.M., Jerome R. In vivo characterization of a novel bioresorbable poly(lactide-co-glycolide) tubular foam scaffold for tissue engineering applications // J. Mater. Sci. Mater. Med. -2004. - V. 15. - N 6. - P. 729-734.

210. Delicat S.E., Galvani D.W., Zuzel M. A function of CD10 on bone marrow stroma // Br. J. Haematol. – 1994. – V. 87. – N 3. – P. 655-657.

211. Delorme B., Chateauvieux S., Charbord P. The concept of mesenchymal stem cells // Regen. Med. -2006. - V. 1. - N. 4. - P. 497-509.

212. Delorme B., Ringe J., Gallay N., Levern Y., Kerboeuf D., Jorgensen C., Rosset P., Sensebé L., Layrolle P., Häupl T., Charbord P. Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells // Blood. – 2008. – V. 111. – N 5. – P. 2631-2635.

213. Deng H., Wang H.F., Gao Y.B., Jin X.L., Xiao J.C. Hepatic progenitor cell represents a transitioning cell population between liver epithelium and stroma // Med. Hypotheses. – 2011. – V. 76. – N 6. – P. 809-812.

214. Dennis J.E., Charbord P. Origin and differentiation of human and murine stroma // Stem Cells. – 2002. – V. 20. – N 3. – P. 205-214.

215. Dennis J.E., Haynesworth S.E., Young R.G., Caplan A.I. Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression // Cell Transplant. – 1992. – V. 1. – N 1. – P. 23-32.

216. Dennis J.E., Merriam A., Awadallah A., Yoo J.U., Johnstone B., Caplan A.I. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse // J. Bone Miner. Res. -1999. - V. 14. - N 5. - P. 700-709.

217. Derfoul A., Perkins G.L., Hall D.J., Tuan R.S. Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes // Stem Cells. – 2006. – V. 24. – N 6. – P. 1487-1495.

218. Deurholt T., ten Bloemendaal L., Chhatta A.A., van Wijk A.C., Weijer K., Seppen J., Elferink R.P., Chamuleau R.A., Hoekstra R. In vitro functionality of human fetal liver cells and clonal derivatives under proliferative conditions // Cell Transplant. – 2006. – V. 15. - N 8-9. – P. 811-822.

219. Dexter T.M. Haemopoiesis in long-term bone marrow cultures. A review // Acta Haematol. – 1979. – V. 62. – N 5-6. – P. 299-305.

220. Diaz-Solano D., Wittig O., Ayala-Grosso C., Pieruzzini R., Cardier J.E. Human olfactory mucosa multipotent mesenchymal stromal cells promote survival, proliferation, and differentiation of human hematopoietic cells // Stem Cells Dev. – 2012. – V. 21. – N 17. – P. 3187-3196.

221. DiGirolamo C. M., Stokes D., Colter D. C. Phinney D. G., Class R., Prockop D. J. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay

identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate // Br. J. Haematol. – 1999. – V. 107. – N 2. – P. 275-281.

222. Di Rocco G., Iachininoto M.G., Tritarelli A., Straino S., Zacheo A., Germani A., Crea F., Capogrossi M.C. Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells // J. Cell Sci. – 2006. – V. 119. – Pt 14. – P. 2945-2952.

223. Djouad F., Delorme B., Maurice M., Bony C., Apparailly F., Louis-Plence P., Canovas F., Charbord P., Noël D., Jorgensen C. Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal stem cells toward chondrocytes // Arthritis Res. Ther. – 2007. – V. 9. – N 2. – P. R33.

224. Djouad F., Plence P., Bony C., TRopel P., Apparailly F., Sany J., Noël D., Jorgensen C. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogenic animals // Blood. – 2003. – V. 102. – N 10. – P. 3837-3844.

225. Docheva D., Popov C., Mutschler W., Schieker M. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system // J. Cell. Mol.Med. – 2007. - V. 11. - N 1. - P. 21-38.

226. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy. – 2006. – V. 8. - N 4. – P. 315-317.

227. Dominici M., Pritchard C., Garlits J.E., Hoffmann T.J., Persons D.A., Horwitz E.M. Hematopoietic cells and osteoblasts are derived from a common marrow progenitor after bone marrow transplantation // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2004. – V. 101. – N 32. – P. 11761-11766.

228. Dong H.-Y., Zhang Z.-M., Zhou Z.-X. Effects of endothelin-1 on differentiation of cardiac myocyte induced from rabbit bone marrow stromal cells // Chin. Med. J. – 2006. – V. 119. – N 10. – P. 832-839.

229. Dong J., Kojima H., Uemura T., Kikuchi M., Tateishi T., Tanaka J. In vivo evaluation of a novel porous hydrozyapatite to sustain osteogenesis of transplanted bone marrow-derived osteoblastic cells // J. Biomed. Mater. Res. – 2001. – V. 57. – N 2. – P. 208-216.

230. Donzelli E., Salvadé A., Mimo P., Viganó M., Morrone M., Papagna R., Carini F., Zaopo A., Miloso M., Baldoni M., Tredici G. Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: In vitro osteogenic differentiation // Arch. Oral Biol. – 2007. – V. 52. – N 1. – P. 64-73.

231. Doucet C., Ernou I., Zhang Y., Llense J.-R., Begot L., Holy X., Lataillade J.-J. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: A safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications // J. Cell. Physiol. – 2005. – V. 205. – N 2. – P. 228-236.

232. Duan H.-Y., Gao E.-M., Zhao R.-Q., Wang L.-X., Hua X. [Rat bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes show intercalated disc-like structure] // Zhongguo Bingli Shengli Zazhi. – 2005. – V. 21. – N 2. – P. 281-284.

233. Ducy P., Schinke T., Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance // Science. – 2000. – V. 289. – N 5484. – P. 1501-1504.

234. Dudas J., Mansuroglo T., Batusic D., Ramadori G. Thy-1 is expressed in myofibroblasts but not found in hepatic stellate cells following liver injury // Histochem. Cell Biol. – 2009. – V. 131. – N 1. – P. 115-127.

235. Dudas J., Mansuroglo T., Batusic D., Saile B., Ramadori G. Thy-1 is an in vivo and in vitro marker of liver myofibroblasts // Cell Tissue Res. – 2007. – V. 329. – N 3. – P. 503-514.

236. Duijvestein M., Vos A.C., Roelofs H., Wildenberg M.E., Wendrich B.B., Verspaget H.W., Kooy-Winkelaar E.M., Koning F., Zwaginga J.J., Fidder H.H., Verhaar A.P., Fibbe W.E., van den Brink G.R., Hommes D.W. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study // Gut. – 2010. – V. 59. – N 12. – P. 1662-1669.

237. Dwyer R.M., Potter-Beirne S.M., Harrington K.A., Lowery A.J., Hennessy E., Murphy J.M., Barry F.P., O'Brien T., Kerin M.J. Monocyte chemotactic protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells // Clin. Cancer Res. – 2007. – V. 13. – N 17. – P. 5020-5027.

238. Dzierzak E., Robin C. Placenta as a source of hematopoietic stem cells // Trends Mol. Med. - 2010. - V. 16. - N 8. - P. 361-367.

239. Eberli D., Soker S., Atala A., Yoo J.J. Optimization of human skeletal muscle precursor cell culture and myofiber formation in vitro // Methods. – 2009 –V. 47. – N 2. – P. 98-103.

240. Eckardt K.U. Erythropoietin production in liver and kidneys // Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. – 1996. – V. 5. – N 1. – P. 28-34.

241. Edgar C.M., Chakravarthy V., Barnes G., Kakar S., Gerstenfeld L.C., Einhorn T.A. Autogenous regulation of a network of bone morphogenetic proteins (BMPs) mediates the osteogenic differentiation in murine marrow stromal cells // Bone. -2007. - V.40. - N5. - P. 1389-1398.

242. Ehninger A., Trumpp A. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in // J. Exp. Med. -2011 - V. 208 - N 3 - P. 421-428.

243. El-Ansary M., Saadi G., Abd El-Hamid S.M. Mesenchymal stem cells are a rescue approach for recovery of deteriorating kidney function // Nephrology (Carlton). – 2012. – V. 17. – N 7. – P. 650-657.

244. Emura I., Sekiya M., Ohnishi Y. Ultrastructural identification of the hemopoietic inductive microenvironment in the human embryonic liver // Arch. Histol. Jpn. – 1984. – V. 47. – N 1. – P. 95-112.

245. Enomoto M.I., Boettiger D., Menko A.S. Alpha 5 integrin is a critical component of adhesion plaques in myogenesis // Dev Biol. – 1993. – V.155. – N 1. – P. 180-197.

246. Faas S.J., Rothstein J.L., Kreider B.L., Rovera G., Knowles B.B. Phenotypically diverse mouse thymic stromal cell lines which induce proliferation and differentiation of hematopoietic cells // Eur. J. Immunol. – 1993. – V. 23. – N 6. – P. 1201-1214.

247. Fang B., Li N., Song Y., Li J., Zhao R.C., Ma Y. Cotransplantation of haploidentical mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells and to reduce the risk of graft failure in two children with severe aplastic anemia // Pediatr. Transplant. – 2009. – V. 13. – N 4. – P. 499-502.

248. Fauza D. Amniotic fluid and placental stem cells // Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. – 2004. – V. 18. – N 6. – P. 877-891.

249. Ferrand J., Noël D., Lehours P., Prochazkova-Carlotti M., Chambonnier L., Menard A., Mégraud F., Varon C. Human bone marrow-derived stem cells acquire epithelial characteristics through fusion with gastrointestinal epithelial cells // PLoS One. – 2011. – V. 6. – N 5. – P. e19569. – doi: 10.1371/journal.pone.0019569.

250. Fickert S., Fiedler J., Brenner R.E. Identification, quantification and isolation of mesenchymal progenitor cells from osteoarthritic synovium by fluorescence automated cell sorting // Osteoarthritis Cartilage. -2003. - V. 11. - P. 790-800.

251. Fiedler J., Etzel N., Brenner R.E. To go or not to go: Migration of human mesenchymal progenitor cells stimulated by isoforms of PDGF // J. Cell Biochem. – 2004. – V. 93. – N 5. – P. 990-998.

252. Fink T., Abildtrup L., Fogd K., Abdallah B.M., Kassem M., Ebbesen P., Zachar V. Induction of adipocytes-like phenotype in human mesenchymal stem cells by hypoxia // Stem Cells. – 2004. – V. 22. – N 7. – P. 1346-1355.

253. Fischer L.J., McLlhenny S., Tulenko T., Golesorkhi N., Zhang P., Larson R., Lombardi J., Shapiro I., DiMuzio P.J. Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells: effects of endothelial cell growth supplement and shear force // J. Surg. Res. – 2009 (a). – V. 152. – N 1. – P. 157-166.

254. Fischer U.M., Harting M.T., Jimenez F., Monzon-Posadas W.O., Xue H., Savitz S.I., Laine G.A., Cox C.S. Jr. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect // Stem Cells Dev. -2009 (b). -V. 18. -N 5. -P. 683-691.

255. Forslöw U., Blennow O., LeBlanc K., Ringdén O., Gustafsson B., Mattsson J., Remberger M. Treatment with mesenchymal stromal cells is a risk factor for pneumonia-related death after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation // Eur. J. Haematol. – 2012. – V. 89. – N 3. – P. 220-227.

256. Fouraschen S.M., Pan Q., de Ruiter P.E., Farid W.R., Kazemier G., Kwekkeboom J., Ijzermans J.N., Metselaar H.J., Tilanus H.W., de Jonge J., van der Laan L.J. Secreted factors of human liver-derived mesenchymal stem cells promote liver regeneration early after partial hepatectomy // Stem Cells Dev. -2012. -V. 21. -N 13. -P. 2410-2419.

257. French M.M., Rose S., Canseco J., Athanasiou K.A. Chondrogenic differentiation of adult dermal fibroblasts // Ann. Biomed. Eng. – 2004. – V. 32. – N 1. – P. 50-56.

258. Freyman T., Polin G., Osman H., Crary J., Lu M., Cheng L., Palasis M., Wilensky R.L. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction // Eur. Heart J. – 2006. – V. 27. – N 9. – P. 1114-1122.

259. Friedenstein A.J., Chailakhyan R.K., Gerasimov U.V. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers // Cell Tissue Kinet. – 1987. – V. 20. – N 3. – P. 263-272.

260. Friedenstein A.J., Gorskaya J.F., Kulagina N.N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs // Exp. Hematol. – 1976. – V. 4. – N 5. – P. 267-274.

261. Friedenstein A.J., Ivanov-Smolenski A.A., Chailakjan R.K., Gorskaya U.F., Kuralesova A.I., Latzinik N.W., Gerasimov U.W. Origin of bone marrow stromal mechanocytes in radiochimeras and heterotopic transplants // Exp. Hematol. – 1978. – V. 6. – N 5. – P. 440-444.

262. Friedenstein A.J., Latsinik N.V., Gorskaya Yu.F., Luria E.A., Moskvina I.L. Bone marrow stromal colony formation requires stimulation by haemopoietic cells // Bone Miner. – 1992. – V. 18. – N 3. – P. 199-213.

263. Friedenstein A.J., Latsinik N.V., Grosheva A.G., Gorskaya U.F. Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges // Exp. Hematol. -1982. - V. 10. - N 2. - P. 217-227.

264. Friedenstein A.Ya., Gorskaya Yu.F., Latsinik N.V., Shuklina E.Yu., Nesterenko V.G. Age-related changes in the content of stromal clonogenic cells in hemopoietic and lymphoid organs // Bull. Exp. Biol. Med. – 1999. – V. 127. – N 5. – P. 496-500.

265. Fromigué O., Hamidouche Z., Chateauvieux S., Charbord P., Marie P. J. Distinct osteoblastic differentiation of murine fetal liver and bone marrow stroma-derived mesenchymal stem cells // J. Cell Biochem. – 2008. – V. 104. – N 2. – P. 620-628.

266. de la Fuente R., Abad J.L., Garcia-Castro J., Fernandez-Miguel G., Petriz J., Rubio D., Vicario-Abejon C., Guillen P., Gonzalez M.A., Bernad A. Dedifferentiated adult articular chondrocytes : a population of human multipotent primitive cells // Exp. Cell Res. – 2004. – V. 297. – N 2. – P. 313-328.

267. Fukuchi Y., Nakajima H., Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K. Human placentaderived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential // Stem Cells. – 2004. – V. 22. – N 5. – P. 649-658.

268. Fukumoto T. Possible developmental interactions of hematopoietic cells and hepatocytes in fetal rat liver // Biomed. Res. – 1992. – V.13. – N 6. – P.385-413.

269. Fukushima N., Ueno K., Ohkawa H., Hayashi Y. Donor stromal cells support hematopoiesis in CFU-S colonies // Exp. Hematol. – 1994. – V. 22. – N 12. – P. 1210-1216.

270. Furlani D., Ugurlucan M., Ong L., Bieback K., Pittermann E., Westien I., Wang W., Yerebakan C., Li W., Gaebel R., Li R.K., Vollmar B., Steinhoff G., Ma N. Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy // Microvasc. Res. – 2009. – V. 77. – N 3. – P. 370-376.

271. Gang E.J., Jeong J.A., Hong S.H., Hwang S.H., Kim S.W., Yang I.H., Ahn C., Han H., Kim H. Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood // Stem Cells. – 2004. – V. 22. – N 4. – P. 617-624.

272. Gao L., McBeath R., Chen C.S. Stem cell shape regulates a chondrogenic versus myogenic fate through Rac-1 and N-cadherin // Stem Cells. – 2010. – V. 28. – N 3. P. 564-572.

273. Garcia-Olmo D., Garcia-Arranz M., Herreros D., Pascual I., Peiro C., Rodríguez-Montes J.A. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation // Dis. Colon. Rectum. -2005. - V. 48. - N7. - P. 1416-1423.

274. Gatti S., Bruno S., Deregibus M.C., Sordi A., Cantaluppi V., Tetta C., Camussi G. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury // Nephrol. Dial. Transplant. – 2011. – V. 26. – N 5. – P. 1474-1483.

275. Gay I.C., Chen S., MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells // Orthod. Craniofac. Rec. – 2007. – V. 10. – N 3. – P. 149-160.

276. George E.L., Georges-Labouesse E.N., Patel-King R.S., Rayburn H., Hynes R.O. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin // Development. – 1993. – V. 119. – N 4. – P. 1079-1091.

277. Gerhart J., Bast B., Neely C., Iem S., Amegbe P., Niewenhuis R., Miklasz S., Cheng P.F., George-Weinstein M. MyoD-positive myoblasts are present in mature fetal organs lacking skeletal muscle // J. Cell Biol. – 2001. – V. 155. – N 3. – P. 381-392.

278. Ghilzon R., McCulloch C.A., Zohar R. Stromal mesenchymal progenitor cells // Leuk. Lymphoma. – 1999. – V. 32. – N 3-4. – P. 211-221.

279. Gimble J.M., Dorheim M.-A., Cheng Q., Medina K., Wang C.-S., Jones R., Koren E., Pietrangeli C., Kincade P.W. Adipogenesis in a murine bone marrow stromal cell line capable of supporting B lineage lymphocyte growth and proliferation: biochemical and molecular characterization // Eur. J. Immunol. – 1990. – V. 20. - N 2. – P. 379-388.

280. Gimble J.M., Morgan C., Kelly K., Wu X., Dandapani V., Wang C.S., Rosen V. Bone morphogenetic proteins inhibit adipocyte differentiation by bone marrow stromal cells // J. Cell. Biochem. – 1995. – V. 58. – N 3. – P. 393-402.

281. Gimble J.M., Wanker F., Wang C.S., Bass H., Wu X., Kelly K., Yancoupoulos G.D., Hill M.R. Regulation of bone marrow stromal cell differentiation by cytokines whose receptors share the gp130 protein // J. Cell. Biochem. – 1994. – V. 543. – N 1. – P. 122-133.

282. Glennon-Alty L., Williams R., Dixon S., Murray P. Induction of mesenchymal stem cell chondrogenesis by polyacrylate substrates // Acta Biomater. – 2012. – V. 9. – N 4. – P. 6041-6051.

283. Goliaeri B., Behboodi A., Samiei S., Soheily Z. The role of macrophages in the stroma of hemopoietic microenvironment // Exp. Hematol. – 1992. – V. 20. - N 6. – P. 812.

284. Gordon J., Manley N.R. Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis // Development. – 2011. – V. 138. – N 18. – P. 3865-3878.

285. Gordon M.Y. Extracellular matrix of the marrow microenvironment // Br. J. Haematol. -1988. – V. 70. – N 1. – P. 1-4.

286. Gordon M.Y., Riley G.P., Watt S.M., Greaves M.F. Compartmentalization of a haematopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment // Nature. – 1987. – V. 326. - N 6111. – P. 403-405.

287. Gornostaeva S.N., Rzhaninova A.A., Gol'dstein D.V. Myogenesis in hemopoietic tissue mesenchymal stem cell culture // Bull. Exp. Biol. Med. – 2006. – V. 141. – N 4. – P. 493–499.

288. Götherström C., Ringdén O., Westgren M., Tammik C., Le Blanc K. Immunomodulatory effects of human foetal liver-derived mesenchymal stem cells // Bone Marrow Transplant. – 2003. – V. 32. – N 3. – P. 265-272.

289. Götherström C., West A., Liden J., Uzunel M., Lahesmaa R., Le Blanc K. Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells // Haematologica. – 2005. – V. 90. – N 8. – P.1017-1026.

290. Grayson W.L., Ma T., Bunnell B. Human mesenchymal stem cells tissue development in 3D PET matrices // Biotechnol. Prog. – 2004. – V. 20. – N 3. – P. 905-912.

291. Greenberger J.S. Corticosteroid-dependent differentiation of human marrow preadipocytes in vitro // In Vitro. – 1979. – V. 15. – N 10. – P. 823-828.

292. Gregoire F.M., Smas C.M., Sul H.S. Understanding adipocyte differentiation // Physiol. Rev. – 1998. – V. 78. – N 3. – P. 783-809.

293. Gregory C.A., Ylostalo J. Prockop D.J. Adult bone marrow stem/progenitor cells (MSCs) are preconditioned by microenvironmental "niches" in culture: a two-stage hypothesis for regulation of MSC fate // Sci. STKE. – 2005. – V. 2005. – N 294. – P. pe37.

294. Grigoriadis A.E., Heersche J.N., Aubin J.E. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population : effects of dexamethasone // J. Cell Biol. – 1988. – V. 106. – N 6. – P. 2139-2151.

295. Gronthos S., Franklin D.M., Leddy H.A., Robey P.G., Storms R.W., Gimble J.M. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells // J. Cell. Physiol. – 2001 (a). – V. 189. – N 1. – P. 54-63.

296. Gronthos S., Graves S.E., Ohta S., Simmons P.J. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors // Blood. – 1994. – V. 84. – N 12. – P. 4164-4173.

297. Gronthos S., Simmons P.J. The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro // Blood. – 1995. – V. 85. – N 4. – P. 929-940.

298. Gronthos S., Simmons P. J., Graves S. E., Robey P. G. Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix // Bone. – 2001 (b). – V. 28. – N 2. – P. 174-181.

299. Gronthos S., Zannettino A.C.W., Hay S.J., Shi S., Graves S., Kortesidis A., Simmons P.J. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow // J. Cell Sci. – 2003. – V. 116. – Pt 9. – P. 1827-1835.

300. Gruber R., Karreth F., Kandler B., Fuerst G., Rot A., Fischer M.B., Watzek G. Plateletreleased supernatants increase migration and proliferation, and decrease osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells under in vitro conditions // Platelets. – 2004. – V. 15. - N 1. - P. 29-35.

301. Guerriero A., Worford L., Holland H.K., Guo G.-R., Sheehan K., Waller E.K. Thrombopoietin is synthesized by bone marrow stromal cells // Blood. – 1997. – V. 90. - N 9. – P. 3444-3455.

302. Guilak F., Lott K.E., Awad H.A., Cao Q., Hicok K.C., Fermor B., Gimble J.M. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells // J. Cell. Physiol. – 2006. – V. 206. – N 1. – P. 229-237.

303. Guillot P. V., De Bari C., Dell'Accio F., Kurata H., Polak J., Fisk N. M. Comparative osteogenic transcription profiling of various fetal and adult mesenchymal stem cell sources // Differentiation. – 2008. – V. 76. – N 9. – P. 946-957.

304. Guillot P. V., Gotherstrom C., Chan J., Kurata H., Fisk N. M. Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC // Stem Cells. – 2007. – V. 25. – N 3. – P. 646-654.

305. Guo Z., Yang J., Liu X., Li X., Hou C., Tang P.-H., Mao N. Biological features of mesenchymal stem cells from human bone marrow // Chin. Med. J. – 2001. – V. 114. – N 9. – P. 950-953.

306. Guo Y., Zhang X., Huang J., Zeng Y., Liu W., Geng C., Li K.W., Yang D., Wu S., Wei H., Han Z., Qian X., Jiang Y., He F. Relationships between hematopoiesis and hepatogenesis in the midtrimester fetal liver characterized by dynamic transcriptomic and proteomic profiles // PLoS One. – 2009. – V. 4. – N 10. – P. e7641. – doi: 10.1371/journal.pone.0007641.

307. Gupta V., Rajaraman S., Costanzi J.J. Effect of oxygen on the clonal growth of adherent cells (CFU-F) from different compartments of mouse bone marrow // Exp. Hematol. – 1987. – V. 15. – N 11. – P. 1153-1157.

308. Guttierrez-Ramos J.C., Olsson C., Palacios R. Interleukin (IL 1 to IL 7) gene expression in fetal liver and bone marrow stromal clones : Cytokine - mediated positive and negative regulation // Exp. Hematol. – 1992. – V. 20. - N 8. – P. 986-990.

309. den Haan J.M., Mebius R.E., Kraal G. Stromal cells of the mouse spleen // Front. Immunol. – 2012. – V. 3. – P. 201. – doi: 10.3389/fimmu.2012.00201.

310. Haddad-Weber M., Prager P., Kunz M., Seefried L., Jakob F., Murray M.M., Evans C.H., Nöth U., Steinert A.F. BMP12 and BMP13 gene transfer induce ligamentogenic differentiation in mesenchymal progenitor and anterior cruciate ligament cells // Cytotherapy. – 2010. – V. 12. – N 4. – P. 505-513.

311. Hakuno D., Fukuda K., Makino S., Konishi F., Tomita Y., Manabe T., Suzuki Y., Umezawa A., Ogawa S. Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors // Circulation. – 2002. – V. 105. – N 3. – P. 380-386.

312. Haleem A.M., Singergy A.A., Sabry D., Atta H.M., Rashed L.A., Chu C.R., El Shewy M.T., Azzam A., Abdel Aziz M.T. The clinical use of human culture-expanded autologous bone marrow mesenchymal stem cells transplanted on platelet-rich fibrin glue in the treatment of articular cartilage defects: A pilot study and preliminary results // Cartilage. – 2010. – V. 1. – N 4. – P. 253-261.

313. Halfon S., Abramov N., Grinblat B., GinisI. Markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts are downregulated with passaging // Stem Cells Dev. -2011. - V. 20. - N 1. - P. 53-66.

314. Han J.Y., Goh R.Y., Seo S.Y., Hwang T.H., Kwon H.C., Kim S.H., Kim J.S., Kim H.J., Lee Y.H. Cotransplantation of cord blood hematopoietic stem cells and culture-expanded and GM-

CSF-/SCF-transfected mesenchymal stem cells in SCID mice // J. Korean Med. Sci. – 2007. – V. 22. – N 2. – P. 242-247.

315. Hanada K., Dennis J.E., Caplan A.I. Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells // J. Bone Mineral Res. – 1997. – V. 12. – N 10. – P. 1606-1614.

316. Hanada K., Solchaga L.A., Caplan A.I., Hering T.M., Goldberg V.M., Yoo J.U., Johnstone B. BMP-2 induction and TGF-beta1 modulation of rat periosteal cell chondrogenesis // J. Cell. Biochem. – 2001. – V. 81. – N 2. – P. 284-294.

317. Hangoc G., Daub R., Falkenburg J.H., Broxmeyer H.E., Harrington M.A. Regulation of myelopoiesis by murine fibroblastic and adipogenic cell lines // Exp. Hematol. – 1993. – V. 21. – N 4. – P. 502-505.

318. Haniffa M.A., Collin M.P., Buckley C.D., Dazzi F. Mesenchymal stem cells: the fibroblast's new clothes? // Haematologica. – 2009. – V. 94. – N 2. – P. 258-263.

319. Hankemeier S., Keus M., Zeichen J., Jagodzinski M., Barkhausen T., Bosch U., Krettek C., Van Griensven M. Modulation of proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells by fibroblast growth factor 2: potential implications for tissue engineering of tendons and ligaments // Tissue Eng. -2005. - V. 11. - N 1-2. - P. 41-49.

320. Hare J.M., Traverse J.H., Henry T.D., Dib N., Strumpf R.K., Schulman S.P., Gerstenblith G., DeMaria A.N., Denktas A.E., Gammon R.S., Hermiller J.B. Jr., Reisman M.A., Schaer G.L., Sherman W. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction // J. Am. Coll. Cardiol. – 2009. – V. 54. – N 24. – P. 2277-2286.

321. Hashimoto J., Kariya Y., Miyazaki K. Regulation of proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by laminin-5 (laminin-332) // Stem Cells. – 2006. – V. 24. – N 11. – P. 2346-2354.

322. Hass R., Otte A. Mesenchymal stem cells as all-round supporters in a normal and neoplastic microenvironment // Cell Commun. Signal. -2012. - V. 10. - N 1. - P. 26.

323. Hattori H. Sato M., Masuoka K., Ishihara M., Kikuchi T., Matsui T., Takase B., Ishizuka T., Kikuchi M., Fujikawa K., Ishihara M. Osteogenic potential of human adipose tissue-derived stromal cells as an alternative stem cell source // Cells Tissues Organs. – 2004. – V. 178. – N 1. – P. 2-12.

324. Hausman G.J., Wright J.T., Richardson R.L. The influence of extracellular matrix substrata on preadipocyte development in serum-free cultures of stromal-vascular cells // J. Anim. Sci. – 1996. – V. 74. – N 9. – P. 2117-2128.

325. Haynesworth S.E., Baber M.A., Caplan A.I. Cytokine expression by human marrowderived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha // J. Cell. Physiol. – 1996. – V. 166. – N 3. – P. 585-592.

326. Hegyi B., Sági B., Kovács J., Kiss J., Urbán V.S., Mészáros G., Monostori E., Uher F. Identical, similar or different? Learning about immunomodulatory function of mesenchymal stem cells isolated from various mouse tissues: bone marrow, spleen, thymus and aorta wall // Int. Immunol. - 2010. – V. 22. - N 7. – P. 551-559.

327. Heino T.J., Alm J.J., Moritz N., Aro H.T. Comparison of the osteogenic capacity of minipig and human bone marrow-derived mesenchymal stem cells // J. Orthop. Res. -2012. - V. 30. - N7. - P. 1019-1025.

328. Heino T.J., Hentunen T.A., Vaananen H.K. Conditioned medium from osteocytes stimulates the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and their differentiation into osteoblasts // Exp. Cell Res. -2004. - V. 294. - N 2. - P. 458-468.

329. Helledie T., Jorgensen C., Antonius M, Krogsdam A., Kratchmarova I., Kristiansen K., Mandrup S. Role of adipocyte lipid-binding protein (ALBP) and acyl-CoA binding protein (ACBP) in PPAR-mediated transactivation // Mol. Cell Biochem. – 2002. – V. 239. – N 1-2. – P. 157-164.

330. Henningsen J., Rigbolt K.T., Blagoev B., Pedersen B.K., Kratchmarova I. Dynamics of the skeletal muscle secretome during myoblast differentiation // Mol. Cell. Proteomics. – 2010. – V. 9. – N 11. – P. 2482-2496.

331. Hermann A., Gastl R., Liebau S., Popa O., Fiedler J., Boehm B.O., Maisel M., Lerche H., Schwarz J., Brenner R., Storch A. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells // J. Cell Sci. – 2004. – V. 117. – Pt 19. - P. 4411-4422.

332. Herrmann R., Sturm M., Shaw K., Purtill D., Cooney J., Wright M., Phillips M., Canneli P. Mesenchymal stromal cell therapy for steroid-refractory acute and chronic graft versus host disease: a phase 1 study // Int. J. Hematol. – 2012. – V. 95. – N 2. – P. 182-188.

333. Hinton R., Petvises S., O'Neill H. Myelopoiesis related to perinatal spleen // Immunol. Cell Biol. – 2011. – V. 89. – N 6. – P. 689-695. 334. Hoffmann A., Peled G., Turgeman G., Eberle P, Zilberman Y, Shinar H, Keinan-Adamsky K, Winkel A, Shahab S, Navon G, Gross G, Gazit D. Neotendon formation induced by manipulation of the Smad8 signalling pathway in mesenchymal stem cells // J. Clin. Invest. – 2006. – V. 116. – N 4. – P. 940-952.

335. Hofmann S., Knecht S., Langer R., Kaplan D.L., Vunjak-Novakovic G., Merkle H.P., Meinel L. Cartilage-like tissue engineering using silk scaffolds and mesenchymal stem cells // Tissue Eng. – 2006. – V. 12. – N 10. – P. 2729-2738.

336. Hoogduijn M.J., Crop M.G., Peeters A.M., Van Osch G.J., Balk A.H., Ijzermans J.N., Weimar W., Baan C.C. Human heart, spleen, and perirenal fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities // Stem Cells Dev. – 2007. – V. 16. – N 4. – P. 597-604.

337. Hori Y., Inoue S., Hirano Y., Tabata Y. Effect of culture substrates and fibroblast growth factor addition on the proliferation and differentiation of rat bone marrow stromal cells // Tissue Eng. - 2004. - V. 10. - N 7-8. - P. 995-1005.

338. Horwitz E.M., Le Blanc K., Dominici M., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Deans R.J., Krause D.S., Keating A.; International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy. -2005. - V. 7. - N 5. - P. 393-395.

339. Horwitz E.M., Prockop D.J., Fitzpatrick L.A., Koo W.W., Gordon P.L., Neel M., Sussman M., Orchard P., Marx J.C., Pyeritz R.E., Brenner M.K. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta // Nat. Med. – 1999. – V. 5. – N 3. – P. 309-313.

340. Hou Z., Nguyen Q., Frenkel B., Nilsson S.K., Milne M., van Wijnen A.J., Stein J.L., Quesenberry P., Lian J.B., Stein G.S. Osteoblast-specific gene expression after transplantation of marrow cells : implications for skeletal gene therapy // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1999. – V. 96. – N 13. – P. 7294-7299.

341. Hu C., Yong X., Li C., Lü M., Liu D., Chen L., Hu J, Teng M, Zhang D, Fan Y, Liang G. CXCL12/CXCR4 axis promotes mesenchymal stem cell mobilization to burn wounds and contributes to wound repair // J. Surg. Red. – 2013. – V. 183. – N 1. – P. 427-434.

342. Hu Y., Liao L., Wang Q., Ma L., Ma G., Jiang X., Zhao R.C. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas // J. Lab. Clin. Med. – 2003. – V. 141. – N 5. – P. 342-349.

343. Hu Y., Ma L., Jiang X., Zhao C. [Comparative study of human fetal and adult bone marrow derived mesenchymal stem cells] // Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi. – 2002. – V. 23. – N 12. – P. 645-648.

344. Hu Y., Zhang L.Y., Ma G.J., Jiang X.Y., Zhao C.H. [Phenotypical and biological characteristics of human fetal marrow and liver mesenchymal stem cells] // Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. – 2001. – V. 9. – N 4. – P. 289-293.

345. Huang C.Y., Hagar K.L., Frost L.E., Sun Y., Cheung H.S. Effects of cyclic compressive loading on chondrogenesis of rabbit bone-marrow derived mesenchymal stem cells // Stem Cells. – 2004. – V. 22. – N 3. – P. 313-323.

346. Huang S., Terstappen L.W.M.M. Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells // Nature. 1992. – V. 360. – N 6406. – P. 745-749.

347. Huang S., Terstappen L.W.M.M. Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells (Correction) // Nature. – 1994. – V. 368. - N 6472. – P. 664.

348. Huang Y., Chen P., Zhang C.B., Ko G.J., Ruiz M., Fiorina P., Hussain M.A., Wasowska B.A., Rabb H., Womer K.L. Kidney-derived mesenchymal stromal cells modulate dendritic cell function to suppress alloimmune responces and delay allograft rejection // Transplantation. – 2010. – V. 90. – N 12. – P. 1307-1311.

349. Hung S.-C., Chen N.-J., Hsieh S.-L., Li H., Ma H.-L., Lo W.-H. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow // Stem Cells. – 2002. – V. 20. – N 3. – P. 249-258.

350. Huss R. Isolation of primary and immortalized CD34- hematopoietic and mesenchymal stem cells from various sources // Stem Cells. -2004. - V. 18. - N 1. - P. 1-9.

351. Huss R., Hong D.S., McSweeney P.A., Hoy C.A., Deeg H.J. Differentiation of canine bone marrow cells with hemopoietic characteristics from an adherent stromal cell precursor // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1995. – V. 92. – N 3. – P. 748-752.

352. Hwang Y., Sangaj N., Varghese S. Interconnected macroporous poly(ethylene glycol) cryogels as a cell scaffold for cartilage tissue engineering // Tissue Eng. Part A. – 2010. – V. 16. – N 10. – P. 3033-3041.

353. Igura K., Zhang X., Takahashi K., Mitsuru A., Yamaguchi S., Takashi A. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta // Cytotherapy. -2004. - V. 6. - N. 6. - P. 543-553.

354. Ilmer M., Karow M., Geissler C., Jochum M., Neth P. Human osteoblast-derived factors induce early osteogenic markers in human mesenchymal stem cells // Tissue Eng. Part A. – 2009. – V. 15. – N 9. – P. 2397-2409.

355. Indrawattana N., Chen G., Tadokoro M., Shann L.H., Ohgushi H., Tateishi T., Tanaka J., Bunyaratvej A. Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2004. – V. 320. – N 3. – P. 914-919.

356. Ingram D.A., Mead L.E., Tanaka H., Meade V., Fenoglio A., Mortell K., Pollok K., Ferkowicz M.J., Gilley D., Yoder M.C. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood // Blood. – 2004. – V. 104. – N 9. – P. 2752-2760.

357. D'Ippolito G., Diabira S., Howard G.A., Menei P., Roos B.A., Schiller P.C. Marrowderived adult multilineage (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential // J. Cell Sci. – 2004. – V. 117. – N 14. – P. 2971-2981.

358. D'Ippolito G., Schikker P.C., Ricordi C., Roos B.A., Howard G.A. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow // J. Bone Miner. Res. – 1999. – V. 14. – N 7. – P. 1115-1122.

359. Isern J., Fraser S.T., He Z., Baron M.H. The fetal liver is a niche for maturation of primitive erythroid cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – V. 105. – N 18. – P. 6662-6667.

360. Iso Y., Spees J.L., Serrano C., Bakondi B., Pochampally R., Song Y.H., Sobel B.E., Delafontaine P., Prockop D.J. Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2007. – V. 354. – N 3. – P. 700-706.

361. Itoh K., Tezuka H., Sakoda H., Konno M., Nagata K., Uchiyama T., Uchino H., Mori K.J. Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow // Exp. Hematol. – 1989. – V. 17. - N 2. – P. 145-153.

362. Ivanović Z., Bartolozzi B., Bernabei P.A., Cipolleschi M.G., Milenkovic P., Praloran V., DelloSbarba P. A simple, one-step clonal assay allows the sequential detection of committed (CFU-

GM-like) progenitors and several subsets of primitive (HPP-CFC) murine progenitors // Stem Cells. – 1999. – V. 17. – N 4. – P. 219-225.

363. Iwasaki H., Arai F., Kubota Y., Dahl M., Suda T. Endothelial protein C receptorexpressing hematopoietic stem cells reside in the perisinusoidal niche in fetal liver // Blood. – 2010. – V. 116. – N 4. – P. 544-553.

364. Iyer S.S., Co C., Rojas M. Mesenchymal stem cells and inflammatory lung diseases // Panminerva Med. – 2009. – V. 51. – N 1. – P. 5-16.

365. Izadpanah R., Joswig T., Tsien F., Dufour J., Kirijan J.C., Bunnell B.A. Characterization of multipotent mesenchymal stem cells from the bone marrow of rhesus macaques // Stem Cells Dev. – 2005. – V. 14. – N 4. – P. 440-451.

366. Jacobsen K., Kravitz J., Kincade P.W., Osmond D.G. Adhesion receptor on bone marrow stromal cells: In vivo expression of vascular cell adhesion molecule - 1 by reticular cells and sinusoidal endothelium in normal and \Box -irradiated mice // Blood. – 1996. – V. 87. - N 1. – P. 73-82.

367. Jaiswal N., Haynesworth S.E., Caplan A.I., Bruder S.P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro // J. Cell. Biochem. – 1997. – V. 64. – N 2. – P. 295-312.

368. Jaiswal R.K., Jaiswal N., Bruder S.P., Mbalaviele G., Marshak D.R., Pittenger M.F. Adult human mesenchymal stem cells differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase // J. Biol. Chem. – 2000. – V. 275. – N 13. – P. 9645-9652.

369. Jancewicz P., Dzienis W., Pietruczuk M., Skowroński J., Bielecki M. Osteochondral defects of the talus treated by mesenchymal stem cell implantation--early results // Rocz. Akad. Med. Bialymst. – 2004. – V. 49. – Suppl. 1. – P. 25-27.

370. Janderova L., McNeil N., Murrell A.N., Mynatt R.L., Smith S.R. Human mesenchymal stem cells as an in vitro model for human adipogenesis // Obes. Res. – 2003. – V. 11. – N 1. – P. 65-73.

371. Janeczek Portalska K., Leferink A., Groen N., Fernandes H., Moroni L., van Blitterswijk C., de Boer J. Endothelial differentiation of mesenchymal stromal cells // PLos One. – 2012. – V. 7. – N 10. – P. e46842. – doi: 10.1371/journal.pone.0046842.

372. Javason E.H., Colter D.C., Schwarz E.J., Prockop D.J. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells // Stem Cells. -2001. - V. 19. - N 3. - P. 219-225.

373. Jelkmann W. Regulation of erythropoietin production // J. Physiol. – 2011. – V. 589. – Pt 6. – P. 1251-1258.

374. Jeong J., Han I., Lim Y., Kim J., Park I., Woods A., Couchman J.R., Oh E.-S. Rat embryo fibroblasts require both cell-binding and the heparin-binding domains of fibronectin for survival // Biochem. J. – 2001. – V. 356. – Pt 2. – P. 531-537.

375. Jiang R., Han Z., Zhuo G., Qu Z., Li X., Wang X., Shao Y., Yang S., Han Z.C. Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cells in type 2 diabetes: a pilot study // Front. Med. – 2011. – V. 5. – N 1. – P. 94-100.

376. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalea X.R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., Largaespada D.A., Verfaillie C.M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow // Nature. – 2002 (a). – V. 418. – P. 41-49.

377. Jiang Y., Vaessen B., Lenvik T., Blackstad M., Reyes M., Verfaillie C.M. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain // Exp. Hematol. – 2002 (b). – V. 30. – N 8. – P. 896-904.

378. Johnstone B., Hering T.M., Caplan A.I., Goldberg V.M., Yoo J.U. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells // Exp. Cell Res. – 1998. – V. 238. – N 1. – P. 265-272.

379. Jones E., McGonagle D. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo // Rheumatology. – 2008. – V. 47. – N 2. – P. 126-131.

380. Joshi M., Patil P.B., He Z., Holgersson J., Olausson M., Sumitran-Holgersson S. Fetal liver-derived mesenchymal stromal cells augment engraftment of transplanted hepatocytes // Cytotherapy. – 2012. – V. 14. – N 6. – P. 657-669.

381. Joyce N., Annett G., Wirthlin L., Olson S., Bauer G., Nolta J.A. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease // Regen. Med. -2010. - V. 5. - N 6. - P. 933-946.

382. Jurga M., Dainiak M.B., Sarnowska A., Jablonska A., Tripathi A., Plieva F.M., Savina I.N., Strojek L., Jungvid H., Kumar A., Lukomska B., Domanska-Janik K., Forraz N., McGuckin C.P. The performance of laminin-containing cryogel scaffolds in neural tissue regeneration // Biomaterials. – 2011. – V. 32. – N 13. – P. 3423-3434.

383. Justesen J., Stenderup K., Eriksen E.F., Kassem M. Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures // Calcif. Tissue Int. -2002. - V.71. - N.1. - P.36-44.

384. Kadiyala S., Young R.G., Thiede M.A., Bruder S.P. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro // Cell Transplant. – 1997. – V. 6. – N 2. – P. 125-134.

385. Kadowaki A., Tsukazaki T., Hirata K., Shibata Y., Okubo Y., Bessho K., Komori T., Yoshida N., Yamaguchi A. Isolation and characterization of a mesenchymal cell line that differentiates into osteoblasts in response to BMP-2 from calvariae of GFP transgenic mice // Bone. – 2004. – V. 34. – N 6. – P. 993-1003.

386. Kalajzic I., Kalajzic Z., Hurley M.M., Lichtler A.C., Rowe D.W. Stage specific inhibition of osteoblast lineage differentiation by FGF2 and noggin. // J. Cell Biochem. – 2003. – V. 88. – N 6. – P. 1168-1176.

387. Kamishina H., Deng J., Oji T., Cheeseman J.A., Clemmons R.M. Expression of neural markers on bone marrow-derived canine mesenchymal stem cells // Am. J. Vet. Res. – 2006. – V. 67. – N 11. – P. 1921-1928.

388. Kang S.K., Putnam L., Dufour J., Ylostalo J., Jung J.S., Bunnell B.A. Expression of telomerase extends the lifespan and enhances osteogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells // Stem Cells. – 2004. – V. 22. – N 7. – P. 1356-1372.

389. Kang X.Q., Zang W.J., Song T.S., Xu X.L., Yu X.J., Li D.L., Meng K.W., Wu S.L., Zhao Z.Y. Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes in vitro // World J. Gastroenterol. – 2005. – V. 11. – N 22. – P. 3479-3484.

390. Kanichai M., Ferguson D., Prendergast P.J., Campbell V.A. Hypoxia promotes chondrogenesis in rat mesenchymal stem cells: a role for AKT and hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha // J. Cell. Physiol. – 2008. – V. 216. – N 3. – P. 708-715.

391. Karussis D., Karageorgiou C., Vaknin-Dembinsky A., Gowda-Kurkalli B., Gomori J.M., Kassis I., Bulte J.W., Petrou P., Ben-Hur T., Abramsky O., Slavin S. Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis // Arch. Neurol. – 2010. – V. 67. – N 10. – P. 1187-1194.

392. Kaufman S.J., Foster R.F. Replicating myoblasts express a muscle-specific phenotype // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1988. – V. 85. – N 24. – P. 9606-9610.

393. Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Jiang Y., Largaespada D.A., Verfaillie C.M., Low W.C. Neural differentiation and incorporation of bone marrow-derived multipotent adult progenitor cells after single cell transplantation into blastocyst stage mouse embryos // Cell Transplant. – 2003. – V. 12. – N 3. – P. 201-213.

394. Kemp K., Gordon D., Wraith D.C., Mallam E., Hartfield E., Uney J., Wilkins A., Scolding N. Fusion between human mesenchymal stem cells and rodent cerebellar Purkinje cells // Neuropathol. Appl. Neurobiol. – 2011. – V. 37. – N 2. – P. 166-178.

395. Kennea N.L., Waddington S.N., Chan J., O'Donoghue K., Yeung D., Taylor D.L., Al-Allaf F.A., Pirianov G., Themis M., Edwards A.D., Fisk N.M., Mehmet H. Differentiation of human fetal mesenchymal stem cells into cells with an oligodendrocyte phenotype // Cell Cycle. – 2009. – V. 8. - N7. - P. 1069-1079.

396. Kern S., Eichler H. Stoeve J., Klüter H., Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue // Stem Cells. – 2006. – V. 24. – N 5. – P. 1294-1301.

397. Kerst J.M., Sanders J.B., Slaper - Cortenbach I.C.M., Doorakkers M.Ch., Hooibrink B., van der Oers R.H.J., von dem Borne A.E.G.Kr., van der Schoot C.E. α 4 β 1 and α 5 β 1 are differentially expressed during myelopoiesis and mediate the adherence of human CD34+ cells to fibronectin in an activation-dependent way // Blood. – 1993. – V. 81. - N 2. – P. 344-351.

398. Kha H.T., Basseri B., Shouhed D., Richardson J., Tetradis S., Hahn T.J., Parhami F. Oxysterols regulate differentiation of mesenchymal stem cells: pro-bone and anti-fat // J. Bone Miner. Res. – 2004. – V. 19. – N 5. – P. 830-840.

399. Kiel M.J., Yilmaz O.H., Iwashita T., Yilmaz O.H., Terhorst C., Morrison S.J. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells // Cell. -2005. - V. 121. - N7. - P. 1109-1121.

400. Kierney P.C., Dorshkind K. B Lymphocyte precursors and myeloid progenitors survive in diffusion chamber cultures but B cell differentiation requires close association with stromal cells // Blood. – 1987. – V. 70. - N 5. – P. 1418-1421.

401. Kii I., Amizuka N., Shimomura J., Saga Y., Kudo A. Cell-cell interaction mediated by cadherin-11 directly regulates the differentiation of mesenchymal cells into the cells of the osteo-lineage and the chondro-lineage // J. Bone Miner. Res. -2004. - V. 19. - N 11. - P. 1840-1849.

402. Kim J., Han I., Kim Y., Kim S., Oh E.-S. C-terminal heparin-binding domain of fibronectin regulates integrin-mediated cell spreading but not the activation of mitogen-activated protein kinase // Biochem. J. -2001. - V.360. - Pt 1. - P.239-245.

403. Kim J.A., Kang Y.J., Park G., Kim M., Park Y.O., Kim H., Leem S.H., Chu I.S., Lee J.S., Jho E.H., Oh I.H. Identification of a stroma-mediated Wnt/beta-catenin signal promoting self-renewal of hematopoietic stem cells in the stem cell niche// Stem Cells. – 2009. – V. 27. – N 6. – P. 1318-1329.

404. Kim J.W., Kim S.Y., Park S.Y., Kim Y.M., Lee M.H., Ryu H.M. Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord // Ann. Hematol. – 2004. – V. 83. – N 12. – P. 733-738.

405. Kim R.H., Mehrazarin S., Kang M.K. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for oral and systemic diseases // Dent. Clin. North Am. -2012 (a). -V.56. -N3. -P.651-675.

406. Kim S.J., Moon G.J., Cho Y.H., Kang H.Y., Hyung N.K., Kim D., Lee J.H., Nam J.Y., Bang O.Y. Circulating mesenchymal stem cells microparticles in patients with cerebrovascular disease // PLoS One. – 2012 (b). – V. 7. – N 5. – P. e37036. - doi: 10.1371/journal.pone.0037036.

407. Kim S.W., Kim S.J., Park S.H., Yang H.G., Kang M.C., Choi Y.W., Kim S.M., Jeun S.S., Sung Y.C. Complete regression of metastatic renal cell carcinoma by multiple injections of engineered mesenchymal stem cells expressing dodecameric TRAIL and HSV-TK // Clin. Cancer Res. – 2013. – V. 19. – N 2. – P. 415-427.

408. Kim T.-J., Jang J.-H., Chung C.-P., Ku Y. Fibronectin fragment promotes osteoblastassociated gene expression and biological activity of human osteoblast-like cell // Biotechnol. Lett. – 2003. – V. 25. – N 23. – P. 2007-2011.

409. Kim Y.H., Yoon D.S., Kim H.O., Lee J.W. Characterization of different subpopulations from bone marrow-derived mesenchymal stromal cells by alkaline phosphatase expression // Stem Cells Dev. – 2012 (c). – V. 21. – N 16. – P. 2958-2968.

410. Kinnaird T., Stabile E., Burnett M.S., Shou M., Lee C.W., Barr S., Fuchs S., Epstein S.E. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms // Circulation. – 2004. – V. 109. – N 12. – P. 1543-1549.

411. Klees R.F., Salasznyk R.M., Kingsley K., Williams W.A., Boskey A., Plopper G.E. Laminin-5 induces osteogenic gene expression in human mesenchymal stem cells through an ERK-dependent pathway // Mol. Biol. Cell. – 2005. – V. 16. – N 2. – P. 881-890.

412. Klein G., Müller C.A., Tillet E., Chu M.-L., Timpl R. Collagen type VI in the human bone marrow microenvironment: A strong cytoadhesive component // Blood. – 1995. – V. 86. - N 5. – P. 1740-1748.

413. Knabe C., Driessens F.C., Planell J.A., Gildenhaar R., Berger G., Reif D., Fitzner R., Radlanski R.J., Gross U. Evaluation of calcium phosphates and experimental calcium phosphate bone cements using osteogenic cultures // J. Biomed. Mater. Res. – 2000. – V. 52. – N 3. – P. 498-508.

414. Knittel T., Kobold D., Saile B., Grundmann A., Neubauer K., Piscaglia F., Ramadori G. Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential // Gastroenterology. – 1999. – V. 117. – N 5. – P. 1205-1221.

415. Knospe W.H., Husseini S.G., Zipori D., Fried W. Hematopoiesis on cellulose ester membranes (CEM) : XV.Combinations of stromal cells support hematopoiesis // Exp. Hematol. – 1990. – V. 18. - N 6. – P. 562.

416. Kobold D., Grundmann A., Piscaglia F., Eisenbach C., Neubauer K., Steffgen J., Ramadori G., Knittel T. Expression of reelin in hepatic stellate cells and during hepatic tissue repair: a novel marker for the differentiation of HSC from other liver myofibriblasts // J. Hepatol. – 2002. – V. 36. - N 5. - P. 607-613.

417. Koç O.N., Day J., Nieder M., Gerson S.L., Lazarus H.M., Krivit W. Allogenic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH) // Bone Marrow Transplant. – 2002. – V. 30. – N 4. – P. 215-222.

418. Koç O.N., Gerson S.L., Cooper B.W., Dyhouse S.M., Haynesworth S.E., Caplan A.I., Lazarus H.M. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy // J. Clin. Oncol. – 2000. – V. 18. – N 2. – P. 307-316.

419. Koç O.N., Peters C., Aubourg P., Raghavan S., Dyhouse S., DeGasperi R., Kolodny E.H., Yoseph Y.B., Gerson S.L., Lazarus H.M., Caplan A.I., Watkins P.A., Krivit W. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells remain host-derived despite successful hematopoietic engraftment after allogenic transplantation in patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases // Exp. Hematol. - 1999. – V. 27. – N 11. – P. 1675-1681.

420. Koenig J.M., Ballantyne C.M., Kumar A.G., Smith C.W., Yoder M.C. Vascular cell adhesion molecule-1 expression and hematopoietic supportive capacity of immortalized murine stromal cell lines derived from fetal liver and adult bone marrow // In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. – 2002. – V. 38. – N 9. – P. 538-543.
421. Koerner J., Nesic D., Romero J. D., Brehm W., Mainil-Varlet P., Grogan S. P. Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells // Stem Cells. – 2006. – V. 24. – N 6. – P. 1613-1619.

422. Koga A., Tokuhashi Y., Ohkawa A., Nishimura T., Takayama K., Ryu J. Effects of fibronectin on osteoinductive capability of fresh iliac bone marrow aspirate in posterolateral spinal fusion in rabbits // Spine. – 2008. – V. 33. – N 12. – P. 1318-1323.

423. Koga H., Muneta T., Ju Y.J., Nagase T., Nimura A., Mochizuki T., Ichinose S., von der Mark K., Sekiya I. Synovial stem cells are regionally specified according to local microenvironments after implantation for cartilage regeneration // Stem Cells. – 2007. – V. 25. – N 3. – P. 689-696.

424. Kögler G., Sensken S., Airey J.A., Trapp T., Müschen M., Feldhahn N., Liedtke S., Sorg R.V., Fischer J., Rosenbaum C., Greschat S., Knipper A., Bender J., Degistirici O., Gao J., Caplan A.I., Colletti E.J., Almeida-Porada G., Müller H.W., Zanjani E., Wernet P. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential // J. Exp. Med. – 2004. – V. 200. – N 2. – P. 123-135.

425. Kolf C.M., Cho E., Tuan R.S. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation // Arthritis Res. Ther. -2007. - V. 9. - N 1. - P. 204.

426. van Koppen A., Joles J.A., van Balkom B.W., Lim S.K., de Kleijn D., Giles R.H., Verhaar M.C. Human embryonic mesenchymal stem cell-derived conditioned medium rescues kidney function in rats with established chronic kidney disease // PLoS One. – 2012. – V. 7. – N 6. – P. e38746. – doi: 10.1371/journal.pone.0038746.

427. Kordes C., Sawitza I., Götze S., Häussinger D. Hepatic stellate cells support hematopoiesis and are liver-resident mesenchymal stem cells // Cell. Physiol. Biochem. – 2013. – V. 31. – N 2-3. – P. 290-304.

428. Kraitchman D.L., Tatsumi M., Gilson W.D., Ishimori T., Kedziorek D., Walczak P., Segars W.P., Chen H.H., Fritzges D., Izbudak I., Young R.G., Marcelino M., Pittenger M.F., Solaiyappan M., Boston R.C., Tsui B.M., Wahl R.L., Bulte J.W. Dynamic imaging of allogeneic mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction // Circulation. – 2005. – V. 112. – N 10. – P. 1451-1461.

429. Kramann R., Kunter U., Brandenburg V.M., Leisten I., Ehling J., Klinkhammer B.M., Knüchel R., Floege J., Schneider R.K. Osteogenesis of heterotopically transplanted mesenchymal stromal cells in rat models of chronic kidney disease // J. Bone Miner. Red. – 2013. – V. 28. – N 12. – P. 2523-2534.

430. Kramer P.R., Nares S., Kramer S.F., Grogan D., Kaiser M. Mesenchymal stem cells acquire characteristics of cells in the periodontal ligament in vitro // J. Dent. Res. - 2004. - V. 83. - N 1. - P. 27-34.

431. Krampera M., Marconi S., Pasini A., Galiè M., Rigotti G., Mosna F., Tinelli M., Lovato L., Anghileri E., Andreini A., Pizzolo G., Sbarbati A., Bonetti B. Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus // Bone. -2007 (a). -V. 40. -N 2. -P. 382-390.

432. Krampera M., Sartoris S., Liotta F., Pasini A., Angeli R., Cosmi L., Andreini A., Mosna F., Bonetti B., Rebellato E., Testi M.G., Frosali F., Pizzolo G., Tridente G., Maggi E., Romagnani S., Annunziato F. Immune regulation by mesenchymal stem cells derived from adult spleen and thymus // Stem Cells Dev. – 2007 (b). – V. 16. – N 5. – P. 797-810.

433. Kratchmarova I., Blagoev B., Haack-Sorensen M., Kassem M., Mann M. Mechanism of divergent growth factor effects in mesenchymal stem cell differentiation // Science. – 2005. – V. 308. – N 5727. – P. 1472-1477.

434. Krupnick A.S., Balsara K.R., Kreisel D., Riha M., Gelman A.E., Estives M.S., Amin K.M., Rosengard B.R., Flake A.W. Fetal liver as a source of autologous progenitor cells for perinatal tissue engineering // Tissue Eng. – 2004. – V. 10. – N 5-6. – P. 723-735.

435. Kubo Y., Kaidzu S., Nakajima I., Takenouchi K., Nakamura F. Organization of extracellular matrix components during differentiation of adipocytes in long-term culture // In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. – 2000. – V. 36. – N 1. – P. 38-44.

436. Kubota H., Yao H.-L., Reid L.M. Identification and characterization of vitamin A-storing cells in fetal liver: Implications for functional importance of hepatic stellate cells in liver development and hematopoiesis // Stem Cells. – V. 25. – N 9. – P. 2339-2349.

437. Kucia M., Machalinski B., Ratajczak M.Z. The developmental deposition of epiblast/germ cell-line derived cells in various organs as a hypothetical explanation of stem cell plasticity? // Acta Neurobiol. Exp. – 2006. – V. 66. - N 4. – P. 331-341.

438. Kucia M., Reca R., Jala V.R., Dawn B., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. Bone-marrow as a home of heterogeneous populations of nonhematopoietic stem cells// Leukemia. – 2005. – V. 19. – N 7. – P. 1118-1127.

439. Kucia M., Wu W., Ratajczak M.Z. Bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells: their developmental origin and biological significance // Dev. Dyn. – 2007. – V. 236. – N 12. – P. 3309-3320.

440. Kühl U., Ocalan M., Timpl R., von der Mark K. Role of laminin and fibronectin in selecting myogenic versus fibrogenic cells from skeletal muscle cells in vitro // Dev. Biol. – 1986. – V. 117. – N 2. – P. 628-635.

441. Kuhn N.Z., Tuan R.S. Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: Implications in tumorigenesis and metastasis // J. Cell. Physiol. – 2009. – V. 222. – N 2. – P. 268-277.

442. Kuo C.K., Tuan R.C. Mechanoactive tenogenic differentiation of human mesenchymal stem cells // Tissue Eng. Part A. – 2008. – V. 14. – N 10. – P. 1615-1627.

443. Kuroda Y., Kitada M., Wakao S., Nishikawa K., Tanimura Y., Makinoshima H., Goda M., Akashi H., Inutsuka A., Niwa A., Shigemoto T., Nabeshima Y., Nakahata T., Nabeshima Y., Fujiyoshi Y., Dezawa M. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2010. – V. 107. – N 19. – P. 8639-8643.

444. Kurozumi K., Nakamura K., Tamiya T., Kawano Y., Ishii K., Kobune M., Hirai S., Uchida H., Sasaki K., Ito Y., Kato K., Honmou O., Houkin K., Date I., Hamada H. Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model // Mol. Ther. – 2005. – V. 11. – N 1. – P. 96-104.

445. Kuznetsov S.A., Mankani M.H., Robey P.G. Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and in vivo bone formation // Transplantation. – 2000. – V. 70. – N 12. – P. 1780-1787.

446. Kwon H.J. Chondrogenesis on sulfonate-coated hydrogels is regulated by their mechanical properties // J. Mech. Behav. Biomed. Mater. – 2013. – V. 17. – P. 337-346.

447. Lai R.C., Arslan F., Tan S.S., Tan B., Choo A., Lee M.M., Chen T.S., Teh B.J., Eng J.K., Sidik H., Tanavde V., Hwang W.S., Lee C.N., El Oakley R.M., Pasterkamp G., de Kleijn D.P., Tan K.H., Lim S.K. Derivation and characterization of human fetal MSCs: an alternative cell source for large-scale production of cardioprotective microparticles // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2010 (a). – V. 48. – N 6. – P. 1215-1224.

448. Lai Y., Sun Y., Skinner C.M., Son E.L., Lu Z., Tuan R.S., Jilka R.L., Ling J., Chen X.D. Reconstitution of marrow-derived extracellular matrix ex vivo: a robust culture system for expanding large-scale highly functional human mesenchymal stem cells // Stem Cells Dev. – 2010 (b). – V. 19. – N 7. – P. 1095-1107.

449. Laino G. Graziano A., d'Aquino R, Pirozzi G, Lanza V, Valiante S, De Rosa A, Naro F,
Vivarelli E, Papaccio G. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering //
J. Cell. Physiol. – 2006. – V. 206. – N 3. – P. 693-701.

450. Lalu M.M., McIntyre L., Pugliese C., Fergusson D., Winston B.W., Marshall J.C., Granton J., Stewart D.J.; Canadian Critical Care Trials Group. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials // PLoS One. – 2012. – V. 7. – N 10. – P. e47559. – doi: 10.1371/journal.pone.0047559.

451. Lamy I., Corlu A., Fardel O., Gandemer V., Rialland M., Leberre C., le Prise P.Y., Fauchet R., Coulombel L., Guguen-Guillouzo C. Rat liver biliary epithelial cells support long-term production of haemopoietic progenitors from human CD34+ cells // Br. J. Haematol. – 1997. – V. 98. – N 3. – P. 560-568.

452. Lange C., Bassler P., Lioznov M.V., Bruns H., Kluth D., Zander A.R., Fiegel H.C. Liverspecific gene expression in mesenchymal stem cells is induced by liver cells // World J. Gastroenterol. - 2005 (a). - V. 11. - N 29. - P. 4497-4504.

453. Lange C., Schroeder J., Lioznov M.V., Zander A.R. High-potential human mesenchymal stem cells // Stem Cells Dev. – 2005 (b). – V. 14. – N 1. – P. 70-80.

454. Lazarus H.M., Haynesworth S.E., Gerson S.L., Caplan A.I. Human bone marrow-derived mesenchymal (stromal) progenitor cells (MPCs) cannot be recovered from peripheral blood progenitor cell collections // J. Hematother. – 1997. – V. 6. – N 5. – P. 447-455.

455. Lazarus H.M., Koc O.N., Devine S.M., Curtin P., Maziarz R.T., Holland H.K., Shpall E.J., McCarthy P., Atkinson K., Cooper B.W., Gerson S.L., Laughlin M.J., Loberiza F.R. Jr., Moseley A.B., Bacigalupo A. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients // Biol. Blood Marrow Transplant. – 2005. – V. 11. – N 5. – P. 389-398.

456. LeBlanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells // Cytotherapy. – 2003. – V. 5. – N 6. – P. 485-489.

457. Le Blanc K., Götherström C., Ringdén O., Hassan M., McMahon R., Horwitz E., Anneren G., Axelsson O., Nunn J., Ewald U., Nordén-Lindeberg S., Jansson M., Dalton A., Aström E., Westgren M. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a

patient with severe osteogenesis imperfecta // Transplantation. – 2005. – V. 78. – N 11. – P. 1607-1614.

458. Lee D.H., Kang S.K., Lee R.H., Ryu J.M., Park H.Y., Choi H.S., Bae Y.C., Suh K.T., Kim Y.K., Jung J.S. Effects of peripheral benzodiazepine receptor ligands on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells // J. Cell. Physiol. -2004 (a). -V. 198. -N 1. -P. 91-99.

459. Lee J.K., Jin H.K., Endo S., Schuchman E.H., Carter J.E., Bae J.S. Intracerebral transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduces amyloid-beta deposition and rescues memory deficits in Alzheimer's disease mice by modulation of immune responses // Stem Cells. -2010. - V. 28. - N 2. - P. 329-343.

460. Lee J.Y., Zhou Z., Taub P.J., Ramcharan M., Li Y., Akinbiyi T., Maharam E.R., Leong D.J., Laudier D.M., Ruike T., Torina P.J., Zaidi M., Majeska R.J., Schaffler M.B., Flatow E.L., Sun H.B. BMP-12 treatment of adult mesenchymal stem cells in vitro augments tendon-like tissue formation and defect repair in vivo // PLoS One. – 2011. – V. 6. – N 3. – P. e17531. - doi: 10.1371/journal.pone.0017531.

461. Lee K.D., Kuo T.K., Whang-Peng J., Chung Y.F., Lin C.T., Chou S.H., Chen J.R., Chen Y.P., Lee O.K. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells // Hepatology. – 2004
(b). – V. 40. – N 6. – P. 1275-1284.

462. Lee R.H., Hsu S.C., Munoz J., Jung J.S., Lee N.R., Pochampally R., Prockop D.J. A subset of human rapidly self-renewing marrow stromal cells preferentially engraft in mice // Blood. – 2006. – V. 107. – N 5. – P. 2153-2161.

463. Lee W.B., Erm S.K., Kim K.Y., Becker R.P. Emperipolesis of erythroblasts within Kupffer cells during hepatic hemopoiesis in human fetus // Anat. Rec. – 1999. – V. 256. – N 2. – P. 158-164.

464. Lendeckel S., Jödicke A., Christophis P., Heidinger K., Wolff J., Fraser J.K., Hedrick M.H., Berthold L., Howaldt H.P. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report // J. Craniomaxillofac. Surg. – 2004. – V. 32. – N 6. - P. 370-373.

465. Lerner C., Harrison D.E. 5-Fluorouracil spares hemopoietic stem cells responsible for long-term repopulation // Exp. Hematol. – 1990. – V. 18. – N 2. – P. 114-118.

466. Lesot H., Fausser J.-L., Akiyama S.K., Staub A., Black D., Kubler M.-D., Ruch J.V. The carboxy-terminal extension of the collagen binding domain of fibronectin mediates interaction with a 165 kDa membrane protein involved in odontoblast differentiation // Differentiation. – 1992. – V. 49. – N 2. – P. 109-118.

467. Li B., Zheng Y.W., Sano Y., Taniguchi H. Evidence for mesenchymal-epithelial transition associated with mouse hepatic stem cell differentiation // PLoS One. – 2011. – V. 6. – N 2. – P. e17092. - doi: 10.1371/journal.pone.0017092.

468. Li C.L., Culter R.L., Johnson G.R. Characterization of hemopoietic activities in media conditioned by a murine marrow-derived adherent cell line. B.Ad. // Exp. Hematol. – 1987. – V. 15. – N 4. – P. 373-381.

469. Li D., Shen B.J., Hou H.S., Shi Q., Zhang L.L., Ma X.F. [Biological characteristics of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells and their response to different growth factors] // Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. – 2006. – V. 14. – N 5. – P. 964-968.

470. Li D., Wang G.Y., Liu Z.F., Shi Y.X., Zhang H., Bai Z.L. Macrophage-associated erythropoiesis and lymphocytopoiesis in mouse fetal liver: ultrastructural and ISH analysis // Cell Biol. Int. – 2004. – V. 28. – N 6. – P. 457-461.

471. Li H., Capetanaki Y. Regulation of the mouse desmin gene: transactivated by MyoD, myogenin, MRF4 and Myf5 // Nucleic Acids Res. – 1993. – V. 21. – N 2. – P. 335-343.

472. Li T., Wu Y. Paracrine molecules of mesenchymal stem cells for hematopoietic stem cell niche // Bone Marrow Res. – 2011. – V. 2011. – ID 353878. – doi: 10.1155/2011/353878.

473. Li W.G., Xu X.X. The expression of N-cadherin, fibronectin during chondrogenic differentiation of MSC induced by TGF-beta (1) // Chin. J. Traumatol. – 2005. – V. 8. – N 6. – P. 349-351.

474. Li W.J., Tuli R., Huang X., Laquerriere P., Tuan R.S. Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold // Biomaterials. – 2005. – V. 26. – N 25. – P. 5158-5166.

475. Li X., Wang D., Liang J., Zhang H., Sun L. Mesenchymal SCT ameliorates refractory cytopenia in patients with systenic lupus erythematosus // Bone Marrow Transplant. – 2013 (a). – V. 48. – N 4. – P. 544-550.

476. Li X.Y., Zheng Z.H., Li X.Y., Guo J., Zhang Y., Li H., Wang Y.W., Ren J., Wu Z.B. Treatment of foot disease in patients with type 2 diabetes mellitus using human umbilical cord blood

mesenchymal stem cells: response and correction of immunological anomalies // Curr. Pharm. Des. – 2013 (b). – V. 19. – N 27. – P. 4893-4899.

477. Li Z., Wei H., Deng L., Cong X., Chen X. Expression and secretion of interleukin-1β, tumour necrosis factor- α and interleukin-10 by hypoxia- and serum-deprivation-stimulated mesenchymal stem cells // FEBS J. – 2010. – V. 277. – N 18. – P. 3688-3698.

478. Lim Y.S., Kim K.A., Jung J. H., Suh K.S., Kim C.Y., Lee H.S. Modulation of cytokeratin expression during in vitro cultivation of human hepatic stellate cells: evidence of transdifferentiation from epithelial to mesenchymal phenotype // Histochem. Cell Biol. – 2002. – V. 118. – N 2. – P. 127-136.

479. Lin J.R., Guo K.Y., Li J.Q., Yan D.A. In vitro culture of human bone marrow mesenchymal stem cell clones and induced differentiation into neuron-like cells // Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao. -2003. - V. 23. - N 3. - P. 251-253, 264.

480. Lin Y., Luo E., Chen X., Liu L., Qiao J., Yan Z., Li Z., Tang W., Zheng X., Tian W. Molecular and cellular characterization during chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and cartilage formation in vivo // J. Cell. Mol. Med. – 2005. – V. 9. – N 4. – P. 929-939.

481. Linder U., Kramer J., Rohwedel J., Schlenke P. Mesenchymal stem or stromal cells: toward a better understanding of their biology? // Transfus. Med. Heaother. – 2010. – V. 37. – N 2. – P. 75-83.

482. Liu A., Zhu P., Li X., Zhang L., Chi F., Wu Z., Song Y., Zhang Y. Ultrastructural study of the hemopoietic microenvironment in human fetal spleen // Chin. Med. Sci. J. – 1994. – V. 9. – N 3. – P. 157-161.

483. Liu G., Hu Y.Y., Zhao J.N., Wu S.J., Xiong Z., Lu R. Effect of type I collagen on the adhesion, proliferation, and osteoblastic gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells // Chin. J. Traumatol. – 2004. – V. 7. – N 6. – P. 358-362.

484. Liu J.W., Dunoyer-Geindre S., Serre-Beinier V., Mai G., Lambert J.F., Fish R.J., Pernod G., Buehler L., Bounameaux H., Kruithof E.K. Characterization of endothelial-like cells derived from human mesenchymal stem cells // J. Thromb. Haemost. – 2007. – V. 5. – N 4. – P. 826-834.

485. Liu K., Chen Y., Zeng Y., Xu L., Liu D., Chen H., Zhang X., Han W., Wang Y., Zhao T., Wang J., Wang J., Han Q., Zhao C., Huang X. Coinfusion of mesenchymal stromal cells facilitates platelet recovery without increasing leukemia recurrence in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation: a randomized, controlled clinical study // Stem Cells Dev. – 2011 (a). – V. 20. – N 10. – P. 1679-1685.

486. Liu M., Yang S.G., Xing W., Lu S.H., Zhao Q.J., Ren H.Y., Chi Y., Ma F.X., Han Z.C. Comparison of hematopoietic supportive capacity between human fetal and adult bone marrow mesenchymal stem cells in vitro // Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. – 2011 (b). – V. 19. – N 4. – P. 1028-1032.

487. Liu T.M., Martina M., Hutmacher D.W., Hui J.H., Lee E.H., Lim B. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages // Stem Cells. – 2006. – V. 25. – N 3. – P. 750-760.

488. Liu W.W., Yu W., Chen J.Y., Ye G.X., Liu Y.M., Chen L.Z., Chen Y.X., Zhang C., Zhong X.Y. [Effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of paraquatinduced lung injury] // Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi. – 2012. – V. 30. – N 11. – P. 811-815.

489. Liu Y., Song J., Liu W., Wan Y., Chen X., Hu C. Growth and differentiation of rat bone marrow stromal cells: does 5-azacytidine trigger their cardiomyogenic differentiation? // Cardiovasc. Res. – 2003. – V. 58. – N 2. – P. 460-468.

490. Long M.W., Briddell R., Walter A.W., Bruno E., Hoffman R. Human hematopoietic stem cell adherence to cytokines and matrix molecules // J. Clin. Invest. – 1992. – V. 90. – N 1. – P. 251-255.

491. Long M.W., Dixit V.M. Thrombospondin functions as a cytoadhesion molecule for human hematopoietic progenitor cells // Blood. – 1990. – V. 75. - N 12. – P. 2311-2318.

492. Lou S., Gu P., Chen F., He C., Wang M., Lu C. The effect of bone marrow stromal cells on neuronal differentiation of mesencephalic neural stem cells in Spargue-Dawley rats // Brain Res. – 2003. – V. 968. – N 1. – P. 114-121.

493. Lovati A.B., Corradetti B., Cremonesi F., Bizzaro D., Consiglio A.L. Tenogenic differentiation of equine mesenchymal progenitor cells under indirect co-culture // Int. J. Artif. Organs. – 2012. – V. 35. – N 11. – P. 996-1005.

494. Losinsky V.I., Galaev I.Jy., Plieva F.M., Savina I.N., Jungvid H., Mattisson B., Polimeric cryogels as promising materials of biotechnological interest // Trends Biotechnol. – 2003. – V. 21. – N 10. – P. 445-451.

495. Lu P., Blesch A., Tuszynski M.H. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? // J. Neurosci. Res. – 2004. – V. 77. – N 2. – P. 174-191.

496. Lu Z., Roohani-Esfahani S.I., Kwok P.C., Zreigat H. Osteoblasts on rod shaped hydroxyapatite nanoparticles incorporated PCL film provide an optimal osteogenic niche for stem cell differentiation // Tissue Eng. Part A. – 2011. – V. 17. – N 11-12. – P. 1651-1661.

497. Lund A.W., Yener B., Stegemann J.P., Plopper G.E. The natural and engineered 3D microenvironment as a regulatory cue during stem cell fate determination // Tissue Eng. Part A. – 2009. – V. 15. – N 3. – P. 371-380.

498. Luo W., Shitaye H., Friedman M., Bennett C.N., Miller J., Macdougald O.A., Hankenson K.D. Disruption of cell-matrix interactions by heparin enhances mesenchymal progenitor adipocyte differentiation // Exp. Cell Res. – 2008. – V. 314. – N 18. – P. 3382-3391.

499. Lyman S.D., James L., Bos T.V., de Vries P., Brasel K., Gliniak B., Hollingsworth L.T., Picha K.S., McKenna H.J., Splett R.R., Fletcher F.A., Maraskovsky E., Farrah T., Foxworthe D., Williams D.E., Beckmann M.P. Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk2 tyrisine kinase receptor: A proliferative factor for primitive hematopoietic cells // Cell. – 1993. – V. 75. - N 6. – P. 1157-1167.

500. MacArthur B.D., Tare R.S., Please C.P., Prescott P., Oreffo R.O. A non-invasive method for in situ quantification of subpopulation behaviour in mixed cell culture // J. R. Soc. Interface. - 2006. - V. 3. - N 6. - P. 63-69.

501. MacCalman C.D., Bardeesy N., Holland P.C., Blaschuk O.W. Noncoordinate developmental regulation of N-cadherin, N-CAM, integrin, and fibronectin mRNA levels during myoblast terminal differentiation // Dev. Dyn. – 1992. – V.195. – N 2. – P. 127-132.

502. Machaj E.K., Grabowska I., Gajkowska A., Jastrzewska M., Oldak T., Moraczewski J., Pojda Z. Differentiation potential of the fetal rat liver-derived cells // Folia Histochem. Cytobiol. – 2005. – V. 43. – N 4. – P. 217-222.

503. Mackay A.M., Beck S.C., Murphy J.M., Barry F.P., Chichester C.O., Pittenger M.F. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow // Tissue Eng. – 1998. – V. 4. – N 4. – P. 415-428.

504. Maeda S., Nobukuni T., Shimo-Onoda K., Hayashi K., Yone K., Komiya S., Inoue I. Sortilin is upregulated during osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells and promotes extracellular matrix mineralization // J. Cell. Physiol. 2002. – V. 193. – N 1. – P. 73-79.

505. Majumdar M.K., Keane-Moore M., Buyander D., Hardy W.B., Moorman M.A., McIntosh K.R., Mosca J.D. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells // J. Biomed. Sci. – 2003. – V. 10. – N 2. – P. 228-241.

506. Majumdar M.K., Thiede M.A., Haynesworth S.E., Bruder S.P., Gerson S.L. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages // J. Hematother. Stem Cell Res. -2000. - V. 9. - N 6. - P. 841-848.

507. Majumdar M.K., Thiede M.A., Mosca J.D., Moorman M., Gerson S.L. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells // J. Cell. Physiol. – 1998. – V. 176. – N 1. – P. 57-66.

508. Makino S., Fukuda K., Miyoshi S., Konishi F., Kodama H., Pan J., Sano M., Takahashi T., Hori S., Abe H., Hata J., Umezawa A., Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro // J. Clin. Invest. – 1999. – V. 103. – N 5. – P. 697-705.

509. Mansilla E., Marín G.H., Drago H., Sturla F., Salas E., Gardiner C., Bossi S., Lamonega R., Guzmán A., Nuñez A., Gil M.A., Piccinelli G., Ibar R., Soratti C. Bloodstream cells phenotypically identical to human mesenchymal bone marrow stem cells circulate in large amounts under the influence of acute large skin damage: new evidence for their use in regenerative medicine // Transplant. Proc. – 2006. – V. 38. – N 3. – P. 967-969.

510. Mansuroglu T., Dudas J., Elmaouhoub A., Joza T.Z., Ramadori G. Hepatoblast and mesenchymal cell-specific gene-expression in fetal rat liver and in cultured fetal rat liver cells // Histochem. Cell Biol. -2009. - V. 132. - N 1. - P. 11-19.

511. Mardon H.J., Bee J., von der Mark K., Owen M.E. Development of osteogenic tissue in diffusion chambers from early precursor cells in bone marrow of adult rats // Cell Tissue Res. – 1987. – V. 250. – N 1. – P. 157-165.

512. von der Mark K., Ocalan M. Antagonistic effects of laminin and fibronectin on the expression of the myogenic phenotype // Differentiation. – 1989. – V. 40. – N 2. – P. 150-157.

513. Marom R., Shur I., Solomon R., Benayahu D. Characterization of adhesion and differentiation markers of osteogenic marrow stromal cells // J. Cell. Physiol. -205. - V. 202. - N 1. - P. 41-48.

514. Martin D.R., Cox N.R., Hathcock T.L., Niemeyer G.P., Baker H.J. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow // Exp. Hematol. – 2002. – V. 30. – N 8. – P. 879-886.

515. Martin I., Muraglia A., Campanile G., Cancedda R., Quarto R. Fibroblast growth factor-2 supports ex vivo expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow // Endocrinology. – 1997. – V. 138. – N 10. – P. 4456-4462.

516. Martin M.A., Bhatia M. Analysis of the human fetal liver hematopoietic microenvironment // Stem Cell Dev. – 2005. – V. 14. – N 5. – P. 493-504.

517. Martino M.M., Mochizuki M., Rothenfluh D.A., Rempel S.A., Hubbell J.A., Barker T.H. Controlling integrin specificity and stem cell differentiation in 2D and 3D environments through regulation of fibronectin domain stability // Biomaterials. -2009. - V. 30. - N 6. - P. 1089-1097.

518. Massague J., Wotton D. Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system // EMBO J. – 2000. – V. 19. – N 8. – P. 1745-1754.

519. Mastrogiacomo M., Muraglia A., Komlev V., Peyrin F., Rustichelli F., Crovace A., Cancedda R. Tissue engineering of bone: search for a better scaffold // Orthop. Craniofac. Res. – 2005. – V. 8. – N 4. – P. 277-284.

520. Matsubara T., Tsutsumi S., Pan H., Hiraoka H., Oda R., Nishimura M., Kawaguchi H., Nakamura K., Kato Y. A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2004. – V. 313. – N 3. – P. 503-508.

521. Mauney J., Volloch V. Progression of human bone marrow stromal cells into both osteogenic and adipogenic lineages is differentially regulated by structural conformation of collagen I matrix via distinct signaling pathways // Matrix Biol. – 2009. – V. 28. – N 5. – P. 239-250.

522. Mazzini L., Mareschi K., Ferrero I., Miglioretti M., Stecco A., Servo S., Carreiro A., Monaco F., Fagioli F. Mesenchymal stromal cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: a long-term safety study // Cytotherapy. – 2012. – V. 14. – N 1. – P. 56-60.

523. Mbalaviele G., Jaiswal N., Meng A., Cheng L., Van Den Bos C., Thiede M. Human mesenchymal stem cells promote human osteoclast differentiation from CD34+ bone marrow hematopoietic progenitors // Endocrinology. – 1999. – V. 140. – N 8. – P. 3736-3743.

524. Mc Beath R., Pirone D.M., Nelson C.M., Bhadriraju K., Chen C.S. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell linesge commitment // Dev. Cell. – 2004. – V. 6. – N 4. – P. 483-495.

525. Meirelles Lda S., Nardi N.B. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization // Br. J. Haematol. – 2003. – V. 123. – N 4. – P. 702-711.

526. Mendes S.C., Robin C., Dzierzak E. Mesenchymal progenitor cells localize within hematopoietic sites throughout ontogeny // Development. – 2005. – V. 132. – N 5. – P. 1127-1136.

527. Mendez-Ferrer S., Michurina T.V., Ferraro F., Mazloom A.R., MacArthur B.D., Lira S.A., Scadden D.T., Ma'ayan A., Enikolopov GN., Frenette P.S. Mesenchymal and hematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche // Nature. – 2010. – V. 466. – N 7308. – P. 829-834.

528. Metcalf D. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells // Nature. – 1989. – V. 339. - N 6219. – P. 27-30.

529. Mets T., Verdonk G. In vitro aging of human bone marrow derived stromal cels // Mech. Ageing Dev. – 1981. – V. 16. – N 1. – P. 81-89.

530. Mias C., Lairez O., Trouche E., Roncalli J., Calise D., Seguelas M.H., Ordener C., Piercecchi-Marti M.D., Auge N., Salvayre A.N., Bourin P., Parini A., Cussac D. Mesenchymal stem cells promote matrix metalloproteinase secretion by cardiac fibroblasts and reduce cardiac ventricular fibrosis after myocardial infarction // Stem Cells. – 2009. – V. 27. – N 11. – P. 2734-2743.

531. Mikhail A.A., Beck E.X., Shafer A., Barut B., Gbur J.S., Zupancic T.J., Schweitzer A.C., Cioffi J.A., Lacaud G., Ouyang B., Keller G., Snodgrass H.R. Leptin stimulates fetal and adult erythroid and myeloid development // Blood. – 1997. – V. 89. - N 5. – P. 1507-1512.

532. Minguell J.J., Conget P., Erices A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells // Braz. J. Med. Biol. Res. – 2000. – V. 33. – N 8. – P. 881-887.

533. Minguel J.J., Erices A., Conget P. Mesenchymal stem cells // Exp. Biol. Med. – 2001. – V. 226. – N 6. – P. 507-520.

534. Minguell J.J., Martinez J., Walter T. Effect of hydrocortisone on the growth of human bone marrow fibroblasts // Br. J. Haematol. – 1982. - V. 52. - N 2. - P. 307-310.

535. Mirmalek-Sani S.-H., Tare R.S., Morgan S.M., Roach H.I., Wilson D.I., Hanley N.A., Oreffo R.O.C. Characterization and multipotentiality of human fetal femur-derived cells: Implications for skeletal tissue regeneration // Stem Cells. – 2006. – V. 24. – N 4. – P. 1042-1053.

536. Miura Y., Gao Z., Miura M., Seo B.M., Sonoyama W., Chen W., Gronthos S., Zhang L., Shi S. Mesenchymal stem cell-organized bone marrow elements: an alternative hematopoietic progenitor resource // Stem Cells. – 2006. – V. 24. – N 11. – P. 2428-2436.

537. Miyake K., Medina K., Ishihara K., Kimoto M., Auerbach R., Kincade P.W. A VCAM like adhesion molecule on murine bone marrow stromal cells mediates binding of lymphocyte precursors in culture // J. Cell Biol. – 1991. – V. 114. - N 3. – P. 557-565.

538. Mohamadnejad M., Alimoghaddam K., Mohyeddin-Bonab M., Bagheri M., Bashtar M., Ghanaati H., Baharvand H., Ghavamzadeh A., Malekzadeh R. Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis // Arch. Iran Med. – 2007. – V. 10. – N 4. – P. 459-466.

539. Möhle R., Salemi P., Moore M.A.S., Rafii S. Expression of interleukin-5 by human bone marrow microvascular endothelial cells: Implication for the regulation of eosinophilopoiesis in vivo // Br. J. Haematol. – 1997. – V. 99. - N 4. – P. 732-738.

540. Mohyeddin-Bonab M., Mohamad-Hassani M.R., Alimoghaddam K., Sanatkar M., Gasemi M., Mirkhani H., Radmehr H., Salehi M., Eslami M., Farhig-Parsa A., Emami-Razavi H., Alemohammad M.G., Solimani A.A., Ghavamzadeh A., Nikbin B. Autologous in vitro expanded mesenchymal stem cell therapy for human old myocardial infarction // Arch. Iran Med. – 207. – V. 10. – N 4. – P. 467-473.

541. Moreno R., Martinez-González I., Rosal M., Farwati A., Gratacós E., Aran J.M. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the rabbit fetal liver // Stem Cells Dev. – V. 19. – N 10. – P. 1579-1588.

542. Morigi M., Imberti B., Zoja C., Corna D., Tomasoni S., Abbate M., Rottoli D., Angioletti S., Benigni A., Perico N., Alison M., Remuzzi G. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure // J. Am. Soc. Nephrol. – 2004. – V. 15. – N 7. – P. 1794-1804.

543. Moriscot C., de Fraipont F., Richard M.J., Marchand M., Savatier P., Bosco D., Favrot M., Benhamou P.Y. Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation in vitro // Stem Cells. – 2005. – V. 23. – N 4. – P. 594-603.

544. Morishita T., Honoki K., Ohgushi H., Kotobuki N., Matsushima A., Takakura Y. Tissue engineering approach to the treatment of bone tumors: three cases of cultured bone grafts derived from patients' mesenchymal stem cells // Artif. Organs. -2006. - V. 30. - N 2. - P. 115-118.

545. Moursi A.M., Damsky C.H., Lull J., Zimmerman D., Doty S.B., Aota S.-I., Globus R.K. Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation // J. Cell Sci. – 1996. – V. 109. – Pt 6. – P. 1369-1380.

546. Moviglia G.A., Fernandez Viña R., Brizuela J.A., Saslavsky J., Vrsalovic F., Varela G., Bastos F., Farina P., Etchegaray G., Barbieri M., Martinez G., Picasso F., Schmidt Y., Brizuela P., Gaeta C.A., Costanzo H., Moviglia Brandolino M.T., Merino S., Pes M.E., Veloso M.J., Rugilo C., Tamer I., Shuster G.S. Combined protocol of cell therapy for chronic spinal cord injury. Report on the electrical and functional recovery of two patients // Cytotherapy. – 2006. – V. 8. – N 3. – P. 202-209.

547. Muraglia A., Cancedda R., Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model // J. Cell Sci. – 2000. – V. 113. – Pt. 7. – P. 1161-1166.

548. Murphy C.M., Matsiko A., Haugh M.G., Gleeson J.P., O'Brien F.J. Mesenchymal stem cell fate is regulated by the composition and mechanical properties of collagen-glycosaminoglycan scaffolds // J. Mech. Behav. Biomed. Mater. – 2012. – V. 11. – P. 53-62.

549. Nagai A., Kim W.K., Lee H.J., Jeong H.S., Kim K.S., Hong S.H., Park I.H., Kim S.U. Multilineage potential of stable human mesenchymal stem cell line derived from fetal marrow // PLoS One. – 2007. – V. 2. – N 12. – P. e1272.

550. Nagaya N., Fujii T., Iwase T., Ohgushi H., Itoh T., Uematsu M., Yamagishi M., Mori H., Kangawa K., Kitamura S. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2004. – V. 287. – N 6. – P. H2670-2676.

551. Nakabayashi A., Kamei N., Sunagawa T, Suzuki O, Ohkawa S, Kodama A, Kamei G, Ochi M. In vivo bioluminescence imaging of magnetically targeted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in skeletal muscle injury model // J. Orthop. Res. – 2013. – V. 31. – N 5. – P. 754-759.

552. Nakagami H., Morishita R., Maeda K., Kikuchi Y., Ogihara T., Kaneda Y. Adipose tissuederived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy // J. Atheroscler. Thromb. – 2006. – V. 13. – N 2. – P. 77-81.

553. Nakamura Y., Wang X., Xu C., Asakura A., Yoshiyama M., From A.H., Zhang J. Xenotransplantation of long-term-cultured swine bone marrow-derived mesenchymal stem cells // Stem Cells. – 2007. – V. 25. – N 3. – P. 612-620.

554. Nakanishi C., Nagaya N., Ohnishi S., Yamahara K., Takabatake S., Konno T., Hayashi K., Kawashiri M.A., Tsubokawa T., Yamagishi M. Gene and protein expression analysis of mesenchymal stem cells derived from rat adipose tissue and bone marrow // Circ. J. – 2011. – V. 75. – N 9. – P. 2260-2268.

555. Nakano K., Hayashi T., Kawai H., Takei Y., Sato Y., Ando K., Ono Y., Jinno S., Kawakami T., Maeda H., Kawai T. Cell culture in vivo by means of diffusion chamber system // Dent. Mater. J. – 2009. – V. 28. – N 4. – P. 382-387.

556. Nanno M., Hata M., Doi H., Satomi S., Yagi H., Sakata T., Suzuki R., Itoh T. Stimulation of in vitro hematopoiesis by a murine fetal hepatocyte clone through cell-cell contact // J. Cell. Physiol. – 1994. – V. 160. – N 3. – P. 445-454.

557. Naruse K., Urabe K., Mukaida T., Ueno T., Migishima F., Oikawa A., Mikuni-Takagaki Y., Itoman M. Spontaneous differentiation of mesenchymal stem cells obtained from fetal rat circulation // Bone. – 2004. – V. 35. – N 4. – P. 850-858.

558. Nathan S., Das De S., Thambyah A., Fen C., Goh J., Lee E.H. Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects: a novel use for adipose tissue // Tissue Eng. – 2003. –V. 9. – N 4. – P. 733-744.

559. Naveiras O., Nardi V., Wenzel P.L., Hauschka P.V., Fahey F., Daley G.Q. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment // Nature. – 2009. – V. 460. – N 7252. – P. 259-263.

560. Nelissen J.M., Torensma R., Pluyter M., Adema G.J., Raymakers R.A., van Kooyk Y., Figdor C.G. Molecular analysis of the hematopoiesis supporting osteoblastic cell line U2-OS // Exp. Hematol. – 2000. – V. 28. – N 4. – P. 422-432.

561. Neubauer M., Fischbach C., Bauer-Kreisel P., Lieb E., Hacker M., Tessmar J., Schulz M.B., Goepferich A., Blunk T. Basic fibroblast growth factor enhances PPARgamma ligand-induced adipogenesis of mesenchymal stem cells // FEBS Lett. – 2004. – V. 577. – N 1-2. – P. 277-283.

562. Neuhuber B., Swanger S.A., Howard L., Mackay A., Fischer I. Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics // Exp. Hematol. – 2008. – V. 36. - N 9. – P. 1176-1185.

563. Neves H., Weerkamp F., Gomes A.C., Naber B.A., Gameiro P., Becker J.D., Lúcio P., Clode N., van Dongen J.J., Staal F.J., Parreira L. Effects of Delta1 and Jagged1 on early human

hematopoiesis: correlation with expression of notch signaling-related genes in CD34+ cells // Stem Cells. – 2006. – V. 24. – N 5. – P. 1328-1337.

564. Nicolaidou V., Wong M.M., Redpath A.N., Ersek A., Baban D.F., Williams L.M., Cope A.P., Horwood N.J. Monocytes induce STAT3 activation in human mesenchymal stem cells to promote osteoblast formation // PLoS One. – 2012. – V. 7. – N 7. – P. e39871. – doi: 10.1371/journal.pone.0039871.

565. Nifontova I., Svinareva D., Petrova T., Drize N. Sensitivity of mesenchymal stem cells and their progeny to medicines used for the treatment of hematoproliferative diseases // Acta Haematol. -2008. - V. 119. - N 2. - P. 98-103.

566. Nikkels P.G., de Yong J.P., Ploemacher R.E. Long-term effects of cytostatic agents on the hemopoietic stroma: a comparison of four different assays // Leuk. Res. – 1987. – V. 11. – N 9. – P. 817-825.

567. Nishioka K., Fujimori Y., Hashimoto-Tamaoki T., Kai S., Qiu H., Kobayashi N., Tanaka N., Westerman K.A., Leboulch P., Hara H. Immortalization of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells by removable simian virus 40T antigen gene: analysis of the ability to support expansion of cord blood hematopoietic progenitor cells // Int. J. Oncol. – 2003. – V. 23. – N 4. – P. 925-932.

568. Nitou M., Ishikawa K., Shiojiri N. Immunohistochemical analysis of development of desmin-positive hepatic stellate cells in mouse liver // J. Anat. – 2000. – V. 197. – Pt 4. – P. 635-646.

569. Noiseux N., Gnecchi M., Lopez-Ilasaca M., Zhang L., Solomon S.D., Deb A., Dzau V.J., Pratt RE. Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation // Mol. Ther. – 2006. – V. 14. - N 6. - P. 840-850.

570. Noshi T., Yoshikawa T., Dohi Y., Ikeuchi M., Horiuchi K., Ichijima K., Sugimura M., Yonemasu K., Ohgushi H. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 potentiates the in vivo osteogenic ability of marrow/hydroxyapatite composites // Artif. Organs. – 2001. – V. 25. – N 3. – P. 201-208.

571. Noth U., Osyczka A.M., Tuli R., Hickok N.J., Danielson K.G., Tuan R.S. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells // J. Orthop. Res. – 2002. – V. 20. – N 5. – P. 1060-1069.

572. Ogawa T., Akazawa T., Tabata Y. In vitro proliferation and chondrogenic differentiation of rat bone marrow stem cells cultured with gelatin hydrogel microspheres for TGF-beta1 release // J. Biomater. Sci. – 2010. – V. 21. – N 5. – P. 609-621.

573. Ogura N., Kawada M., Chang W.-J., Zhang Q., Lee S.-Y., Kondoh T., Abiko Y. Differentiation of the human mesenchymal stem cells derived from bone marrow and enhancement of cell attachment by fibronectin // J. Oral Sci. – 2004. – V. 46. – N 4. – P. 207-213.

574. Oh I.-H. Mesenchymal stromal cells: new insight on their identity and potential role in cell therapy // Korean J. Hematol. – 2010. – V. 45. - N 4. – P. 219-221.

575. Ohishi M., Schipani E. Bone marrow mesenchymal stem cells // J. Cell. Biochem. – 2010.
V. 109. – N 2. – P. 277-282.

576. Ohneda O., Bautch V.L. Murine endothelial cells support fetal liver erythropoiesis and myelopoiesis via distinct interactions // Br. J. Haematol. – 1997. – V. 98. – N 4. – P. 798-808.

577. Okubo T., Matsui N., Yanai N., Obinata M. Stroma-dependent maintenance of cytokine responsive hematopoietic progenitor cells derived from long-term bone marrow culture // Cell Struct. Funct. – 2000. – V. 25. – N 2. – P. 133-139.

578. Okumura T., Wang S.S., Takaishi S., Tu S.P., Ng V., Ericksen R.E., Rustgi A.K., Wang T.C. Identification of a bone marrow-derived mesenchymal progenitor cell subset that can contribute to the gastric epithelium // Lab Invest. – 2009. – V. 89. - N 12. – P. 1410-1422.

579. Okuyama R., Koguma M., Yanai N., Obinata M. Bone marrow stromal cells induce myeloid and lymphoid development of the sorted hematopoietic stem cells in vitro // Blood. – 1995. – V. 86. - N 7. - P. 2590-2597.

580. Olmsted-Davis E.A., Gugala Z., Camargo F., Gannon F.H., Jackson K., Kienstra K.A., Shine H.D., Lindsey R.W., Hirschi K.K., Goodell M.A., Brenner M.K., Davis A.R. Primitive adult hematopoietic stem cells can function as osteoblast precursors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – V. 100. – N 26. – P. 15877-15882.

581. Olson E.N. MyoD family: a paradigm for development? // Genes Dev. – 1990. – V. 4. – N 9. – P. 1454-1461.

582. Ong S.Y., Dai H., Leong K.W. Hepatic differentiation potential of commercially available human mesenchymal stem cells // Tissue Eng. – 2006. – V. 12. – N 12. – P. 3477-3485.

583. Oshima Y., Watanabe N., Matsuda K., Takai S., Kawata M., Kubo T. Behaviour of transplanted bone marrow-derived GFP mesenchymal cells in osteochondral defect as a stimulation of autologous transplantation // J. Histochem. Cytochem. -2005. - V. 53. - N 2. - P. 207-216.

584. Oswald J., Boxberger S., Jørgensen B., Feldmann S., Ehninger G., Bornhäuser M., Werner C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro // Stem Cells. – 2004. – V. 22. – N 3. – P. 377-384.

585. Owen M. Marrow stromal stem cells // J. Cell Sci. - 1988. - Suppl. 10. - P. 63-76.

586. Owen M.E., Cave J., Joyner C.J. Clonal analysis in vitro of osteogenic differentiation of marrow CFU-F // J. Cell Sci. – 1987. – V. 87. – Pt. 5. – P. 731-738.

587. Owen M., Friedenstein A.J. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors // Ciba Found Symp. – 1988. – V. 136. – P. 42-60.

588. Oyagi S., Hirose M., Kojima M., Okuyama M., Kawase M., Nakamura T., Ohgushi H., Yagi K. Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl4injured rats // J. Hepatol. – 2006. – V. 44. – N 4. – P. 742-748.

589. Pan Q., Fouraschen S.M., Kaya F.S., Verstegen M.M., Pescatori M., Stubbs A.P., van Ijcken W., van der Sloot A., Smits R., Kwekkeboom J., Metselaar H.J., Kazemier G., de Jonge J., Tilanus H.W., Wagemaker G., Janssen H.L., van der Laan I.J. Mobilization of hepatic mesenchymal stem cells from human liver grafts // Liver Transpl. – 2011. – V. 17. – N 5. – P. 596-609.

590. Panepucci R.A., Siufi J.L., Silva W.A. Jr, Proto-Siquiera R., Neder L., Orellana M., Rocha V., Covas D.T., Zago M.A. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrowderived mesenchymal stem cells // Stem Cells. – 2004. – V. 22. – N 7. – P. 1263-1278.

591. Papaccio G., Graziano A., d'Aquino R., Graziano M.F., Pirozzi G., Menditti D., De Rosa A., Carinci F., Laino G. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair // J. Cell. Physiol. – 2006. – V. 208. – N 2. – P. 319-325.

592. Park J.H., Kim D.Y., Sung I.Y., Choi G.H., Jeon M.H., Kim K.K., Jeon S.R. Long-term results of spinal cord injury therapy using mesenchymal stem cells derived from bone marrow in humans // Neurosurgery. – 2012. – V. 70. – N 5. – P. 1238-1247.

593. Park Y.J., Lee Y.M., Park S.N., Sheen S.Y., Chung C.P., Lee S.J. Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration // Biomaterials. -2000. - V. 21. - N 2. - P. 153-159.

594. Patrikoski M., Juntunen M., Boucher S., Campbell A., Vemuri M.C., Mannerström B., Miettinen S. Development of fully defined xeno-free culture system for the preparation and propagation of cell therapy-compliant human adipose stem cells // Stem Cell Res. Ther. – 2013. - V. 4. – N 2. – P. 27.

595. Paul P., Rothmann S.A., McMahon J.T., Gordon A.S. Erythropoietin secretion by isolated rat Kupffer cells // Exp. Hematol. – 1984. – V. 12. – N 11. – P. 825-830.

596. Paul S.R., Yang Y.-C., Donahue R.E., Goldring S., Williams D.A. Stromal cell - associated hematopoiesis: Immortalization and characterization of a primate bone marrow - derived stromal cell line // Blood. – 1991. – V. 77. - N 8. – P. 1723-1733.

597. Peister A., Mellad J.A., Larson B.L., Hall B.M., Gibson L.F., Prockop D.J. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential // Blood. – 2004. – V. 103. – N 5. – P. 1662-1668.

598. Pelaez D., Arita N., Cheung H.S. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) dictates osteogenic and/or chondrogenic lineage commitment of mesenchymal stem cells under dynamic compression // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2012. – V. 417. – N 4. – P. 1286-1291.

599. Peng L., Jia Z., Yin X., Zhang X., Liu Y., Chen P., Ma K., Zhou C. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue // Stem Cells Dev. – 2008. – V. 17. – N 4. – P. 761-773.

600. Peng Y., Ke M., Xu L., Liu L., Chen X., Xia W., Li X., Chen Z., Ma J., Liao D., Li G., Fang J., Pan G., Xiang A.P. Donor-derived mesenchymal stem cells combined with low-dose tacrolimus prevent acute rejection after renal transplantation: a clinical pilot study // Transplantation. – 2013. – V. 95. – N 1. – P. 161-168.

601. Pereira R.F., Halford K.W., O'Hara M.D., Leeper D.B., Sokolov B.P., Pollard M.D., Bagasra O., Prockop D.J. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1995. – V. 92. – N 11. - P. 4857-4861.

602. Pereira R.F., O'Hara M.D., Laptev A.V., Halford K.W., Pollard M.D., Class R., Simon D., Livezey K., Prockop D.J. Marrow stromal cell as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1998. – V. 95. – N 3. – P. 1142-1147.

603. Perkins S., Fleischman R.A. Stromal cell progeny of murine bone marrow fibroblast colony - forming units are clonal endothelial - like cells that express collagen IV and laminin // Blood. - 1990. - V. 75. - N 3. - P. 620-625.

604. Peterson J.A., Sheibani N., David G., Garcia-PardoA., Peters D.M. Heparin II domain of fibronectin uses α4β1 integrin to control focal adhesion and stress fiber formation, independent on syndecan-4 // J. Biol. Chem. – 2005. – V. 280. – N 8. – P. 6915-6922.

605. Phinney D.G., Kopen G., Isaacson R.L., Prockop D.J. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation // J. Cell Biochem. – 1999 (a). – V. 72. –N 4. – P. 570-585.

606. Phinney D.G., Kopen G., Righter W., Webster S., Tremain N., Prockop D.J. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells // J. Cell Biochem. – 1999 (b). – V. 75. – N 3. – P. 424-436.

607. Phinney D.G., Prockop D.J. Concise review: mesenchymal stem / multi-potent stromal cells (MSCs): the state of transdifferentiation and modes of tissue repair – current views // Stem Cells. – 2007. – V. 25. – N 11. – P. 2896-2902.

608. Pierantozzi E., Gava B., Manini I., Roviello F., Marotta G., Chiavarelli M., Sorrentino V. Pluripotency regulators in human mesenchymal stem cells: expression of NANOG but not of OCT-4 and SOX-2 // Stem Cells Dev. – 2011. – V. 20. – N 5. – P. 915-923.

609. Pitaru S., Kotev-Emeth S., Noff D., Kaffuler S., Savion N. Effect of basic fibroblast growth factor on the growth and differentiation of adult stromal bone marrow cells: enhanced development of mineralized bone-like tissue in culture // J. Bone Miner. Res. – 1993. – V. 8. – N 8. – P. 919-929.

610. Pittenger M., Marshak D.R. Mesenchymal stem cells of human adult bone marrow // Stem Cell Biology / Eds. Marshak D.R., Gottlieb D., Gardner R. – N-Y., Cold Spring Harbor: The Cold Spring Harbor Laborotory Press, 2001. – P. 349-373.

611. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // Science. – 1999. – V. 284. – N 5411. – P. 143-147.

612. Planat-Bénard V., Menard C., André M., Puceat M., Perez A., Garcia-Verdugo J.M., Pénicaud L., Casteilla L. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells // Circ. Res. – 2004. – V. 94. – N 2. – P. 223-229.

613. Plews J.R., Li J.L., Jones M., Moore H.D., Mason C., Andrews P.W., Na J. Activation of pluripotency genes in human fibroblast cells by a novel mRNA based approach // PLoS One. – 2010. – V. 5. – N 12. – P. e14397. - doi: 10.1371/journal.pone.0014397.

614. Pochampally R.R., Smith J.R., Ylostalo J., Prockop D.J. Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes // Blood. -2004. - V. 103. - N 5. - P. 1647-1652.

615. Poliard A., Nifuji A., Lamblin D., Plee E., Forest C., Kellermann O. Controlled conversion of an immortalized mesodermal progenitor cell towards osteogenic, chondrogenic, or adipogenic pathways // J. Cell Biol. – 1995. – V. 130. – N 6. – P. 1461- 1472.

616. Ponomaryov T., Peled A., Petit I., Taichman R.S., Habler L., Sandbank J., Arenzana-Seisdedos F., Magerus A., Caruz A., Fujii N., Nagler A., Lahav M., Szyper-Kravitz M., Zipori D., Lapidot T. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function // J. Clin. Invest. – 2000. – V. 106. – N 11. – P. 1331-1339.

617. Popov C., Radic T., Haasters F., Prall W.C., Aszodi A., Gullberg D., Schieker M., Docheva D. Integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 11\beta 1$ regulate the survival of mesenchymal stem cells on collagen I // Cell Death Dis. – 2011. – V. 2. – P. e186. – doi: 10.1038/cddis.2011.71.

618. Priglinger S.G., Alge C.S., Neubauer A.S., Kristin N., Hirneiss C., Eibl K., Kampik A., Welge-Lussen U. TGF-β2-induced cell surface tissue transglutaminase increases adhesion and migration of RPE cells on fibronectin through the gelatin-binding domain // Invest. Ophtalmol. Vis. Sci. – 2004. – V. 45. – N 3. – P. 955-963.

619. Prockop D.J., Gregory C.A., Spees L. One strategy for cell and gene therapy: Harnessing the power of adult stem cells to repair tissues // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2003. – V. 100. – Suppl. 1. – P. 11917-11923.

620. Prockop D.J., Sekiya I., Colter D.C. Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells // Cytotherapy. – 2001. – V. 3. – N 5. – P. 393-396.

621. Psaila B., Lyden D., Roberts I. Megakaryocytes, malignancy and bone marrow vascular niches // J. Thromb. Haemost. – 2012. – V. 10. – N 2. – P. 177-188.

622. Qu T.Y., Dong X.J., Sugaya I., Vaghani A., Pulido J., Sugaya K. Bromodeoxyuridine increases multipotency of human bone marrow-derived stem cells // Restor. Neurol. Neurosci. – 2004. – V. 22. – N 6. – P. 459-468.

623. Quarto R., Campanile G., Cancedda R., Dozin B. Modulation of commitment, proliferation, and differentiation of chondrogenic cells in defined culture medium // Endocrinology. – 1997. – V. 138. – N 11. – P. 4966-4976.

624. Quesenberry P.J., Temeles D.S., McGrath H.E., Crittenden R. Growth factor production by murine adherent cell populations // Exp. Hematol. – 1990. – V. 18. - N 6. - P. 566.

625. Quirici N., Soligo D., Bossolasco P., Servida F., Lumini C., Deliliers G. L. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies // Exp Hematol. – 2002. – V. 30. – N 7. – P. 783-791.

626. Raff M. Adult stem cell plasticity: Fact or artifact? // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. – 2003. – V. 19. – P. 1-22.

627. Rafii S., Mohle R., Shapiro F., Frey B.M., Moore M.A. Regulation of hematopoiesis by microvascular endothelium // Leuk. Lymphoma. – 1997. – V. 27. – N 5-6. – P. 375-386.

628. Rahaman M.N., Mao J.J. Stem cell-based composite tissue constructs for regenerative medicine // Biotechnol. Bioeng. – 2005. – V. 91. – N 3. – P. 261-284.

629. Ramadori G., Saile B. Mesenchymal cells in the liver – one cell type or two? // Liver. – 2002. – V. 22. – N 4. – P. 283-294.

630. Ramírez M., Lucia A., Gómez-Gallego F., Esteve-Lanao J., Pérez-Martínez A., Foster C., Andreu A.L., Martin M.A., Madero L., Arenas J., García-Castro J. Mobilisation of mesenchymal cells into blood in response to skeletal muscle injury // Br. J. Sports Med. – 2006. – V. 40. – N 8. – P. 719-722.

631. Ramsey W.S., Hertl W., Nowlan E.D., Binkowski N.J. Surface treatments and cell attachment // In Vitro. – 1984. – V. 20. – N 10. – P. 802-808.

632. Rasmusson I., Ringden O., Sundberg B., Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms // Exp. Cell Res. – 2005. – V. 305. – N 1. – P. 33-41.

633. Ratajczak M.Z., Kucia M., Majka M., Reca R., Ratajczak J. Heterogeneous populations of bone marrow stem cells--are we spotting on the same cells from the different angles? // Folia Histochem. Cytobiol. – 2004. – V. 42. – N 3. – P. 139-146.

634. Reese J.S., Koç O.N., Gerson S.L. Human mesenchymal stem cells provide stromal support for efficient CD34+ transduction // J. Hematother. Stem Cell Res. – 1999. – V. 8. – N 5. – P. 515-523.

635. Reinders M.E., de Fijter J.W., Roelofs H., Bajema I.M., de Vries D.K., Schaapherder A.F., Claas F.H., van Miert P.P., Roelen D.L., van Kooten C., Fibbe W.E., Rabelink T.J. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of allograft rejection after renal transplantation: results of a phase I study // Stem Cells Transl. Med. – 2013. – V. 2. – N 2. – P. 107-111.

636. Ren H., Cao Y., Zhao Q., Li J., Zhou C., Liao L., Jia M., Zhao Q., Cai H., Han Z.C., Yang R., Chen G., Zhao R.C. Proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells under hypoxic conditions // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2006. – V. 347. – N 1. – P. 12-21.

637. Rhodes N.P., Srivastava J.K., Smith R.F., Longinotti C. Heterogeneity in proliferative potential of ovine mesenchymal stem cell colonies // J. Mater. Sci. Mater. Med. -2004. - V. 15. - N 4. - P. 397-402.

638. Ribeiro K.C., Mattos E.C., Werneck-de-castro J.P., Ribeiro V.P., Costa-e-Sousa R.H., Miranda A., Olivares E.L., Farina M., Mill J.G., Goldenberg J.R., Masuda M.O., de Carvalho A.C. Ectopic ossification in the scar tissue of rats with myocardial infarction // Cell Transplant. – 2006. – V. 15. – N 5. – P. 389-397.

639. Rich I.N. The effect of 5-fluorouracil on erythropoiesis // Blood. – 1991. – V. 77. – N 6. – P. 1164-1170.

640. Riekstina U., Cakstina I., Parfejevs V., Hoogduijn M., Jankovskis G., Muiznieks I., Muceniece R., Ancans J. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis // Stem Cell Rev. – 2009. – V. 5. – N 4. – P. 378-386.

641. Rios M., Williams D.A. Systematic analysis of the ability of stromal cell lines derived from different murine adult tissues to support maintenance of hematopoietic stem cells // Exp. Hematol. – 1990. – V. 18. – N 6. – P. 568.

642. Roberts R., Gallagher J., Spooncer E., Allen T.D., Bloomfield F., Dexter T.M. Heparan sulphate bound growth factors: a mechanism for stromal cell mediated haemopoiesis // Nature. – 1988. – V. 332. - N 6162. – P. 376-378.

643. Robin C., Bollerot K., Mendes S., Haak E., Crisan M., Cerisoli F., Lauw I., Kaimakis P., Jorna R., Vermeulen M., Kayser M., van der Linden R., Imanirad P., Verstegen M., Nawaz-Yousaf H., Papazian N., Steegers E., Cupedo T., Dzierzak E. Human placenta is a potent hematopoietic niche containing hematopoietic stem and progenitor cells throughout development // Cell Stem Cell. – 2009. – V. 5. – N 4. – P. 385-395.

644. Di Rocco G., Tritarelli A., Toietta G., Gatto I., Iachininoto M.G., Pagani F., Mangoni A., Straino S., Capogrossi M.C. Spontaneous myogenic differentiation of Flk-1-positive cells from adult pancreas and other nonmuscle tissues // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2008. – V. 294. – N 2. – P. C604-C612.

645. Rochefort G. Y., Delorme B., Lopez A., Hérault O., Bonnet P., Charbord P., Eder V., Domenech J. Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia // Stem Cells. – V. 24. – N 10. – P. 2202-2208.

646. Rodrigues S.C., Salgado C.L., Sahu A., Garcia M.P., Fernandes M.H., Monteiro F.J. Preparation and characterization of collagen-nanohydroxyapatite biocomposite scaffolds by cryogelation method for bone tissue engineering applications // J. Biomed. Mater. Res. A. -2013. - V. 101. - N 4. - P. 1080-1094.

647. Rodriguez Mdel C., Bernad A., Aracil M. Interleukin-6 deficiency affects bone marrow stromal precursors, resulting in defective hematopoietic support // Blood. – 2004. – V. 103. – N 9. – P. 3349-3354.

648. Rodriguez-Lorenzo L.M., Saldaña L., Benito-Garzón L., García-Carrodeguas R., de Aza S., Vilaboa N., Román J.S. Feasibility of ceramic-polymer composite cryogels as scaffolds for bone tissue engineering // J. Tissue Eng. Regen. Med. – 2012. – V. 6. – N 6. – P. 421-433.

649. Rogers J.A., Berman J.W. Tumor necrosis factor - responsive long - term - culture - initiating cell is associated with the stromal layer of mouse long - term bone marrow cultures // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1993. – V. 10. - N 12. – P. 5777-5780.

650. Rojas M., Xu J., Woods C.R., Mora A.L., Spears W., Roman J., Brigham K.L. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. – 2005. – V. 33. – N 2. – P. 145-152.

651. Romanov Y.A., Svintsitskaya V.A., Smirnov V.N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord // Stem Cells. -2003. - V. 21. - N 1. - P. 105-110.

652. Rose O., Rohwedel J., Reinhardt S., Bachmann M., Cramer M., Rotter M., Wobus A., Starzinski-Powitz A. Expression of M-cadherin protein in myogenic cells during prenatal mouse development and differentiation of embryonic stem cells in culture // Dev. Dyn. – 1994. – V. 201. – N 3. – P. 245-259.

653. Roura S., Farré J., Soler-Botija C., Llach A., Hove-Madsen L., Cairó J.J., Gódia F., Cinca J., Bayer-Genis A. Effect of aging on the pluripotential capacity of human CD105+ mesenchymal stem cells // Eur. J. Heart Fail. – 2006. – V. 8. – N 6. – P. 555-563.

654. Rowlands A.S., George P.A., Cooper-White J.J. Directing osteogenic and myogenic differentiation of MSCs: interplay of stiffness and adhesive ligand presentation // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2008. – V. 295. – N 4. – P. C1037-1044.

655. Rubio D., Garcia S., Paz M.F., De la Cueva T., Lopez-Fernandez L.A., Lloyd A.C., Garcia-Castro J., Bernad A. Molecular characterization of spontaneous mesenchymal stem cell transformation. // PLoS One. – 2008. - V. 3. – N 1. – P. e1398. – doi: 10.1371/journal.pone.0001398.

656. Ruoslahti E., Yamaguchi Y. Proteoglycans as mediators of growth factor activities // Cell. - 1991. - V. 64. - N 5. - P. 867-869.

657. Russell K.C., Phinney D.G., Lacey M.R., Barrilleaux B.L., Meyertholen K.E., O'Connor K.C. In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment // Stem Cells. – 2010. – V. 28. – N 4. – P. 788-798.

658. Rüster B., Grace B., Seitz O., Seifried E., Henschler R. Induction and detection of human mesenchymal stem cell migration in the 48-well reusable transwell assay // Stem Cells Dev. – 2005. – V. 14. – N 2. – P. 231-235.

659. Ryden M., Dicker A., Gotherstrom C., Astrom G., Tammik C., Arner P., Le Blanc K. Functional characterization of human mesenchymal stem cell-derived adipocytes // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2003. – V. 311. – N 2. – P. 391-397.

660. Sabatini F., Petecchia L., Tavian M., Jodon de Villeroché. V, Rossi G.A., Brouty-Boyé D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities // Lab. Invest. – 2005. – V. 85. – N 8. – P. 962-971.

661. Sadlon T.J., Lewis I.D., D'Andrea R.J. BMP4: Its role in development of the hematopoietic system and potential as a hematopoietic growth factor // Stem Cells. -2004. - V. 22. - N 4. - P. 457-474.

662. Safadi A., Livne E., Reznick A.Z. Characterization of alkaline and acid phosphatases from skeletal muscles of young and old rats // Arch. Gerontol. Geriatr. – 1997. – V. 24. – N 2. – P. 183-196.

663. Safford K.M., Safford S.D., Gimble J.M., Ahetty A.K., Rice H.E. Characterization of neuronal / glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells // Exp. Neurol. – 2004. – V. 187. – N 2. – P. 319-328.

664. Sági B., Maraghechi P., Urbán V.S., Hegyi B., Szigeti A., Fajka-Boja R., Kudlik G., Német K., Monostori E., Gócza E., Uher F. Positional identity of murine mesenchymal stem cells resident in different organs is determined in the postsegmentation mesoderm // Stem Cells Dev. - 2012. - V. 21. - N 5. - P. 814-828.

665. Saino E., Fassina L., Van Vlierberghe S., Avanzini M.A., Dubruel P., Magenes G., Visai L., Benazzo F. Effects of electromagnetic stimulation on osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells seeded onto gelatin cryogel // Int. J. Immunopathol. Pharmacol. – 2011. – V. 24. – N 1. – Suppl. 2. – P. 1-6.

666. Sakai T., Ohta M., Kawakatsu H., Furukawa Y., Saito M. Tenascin-C induction in Whitlock - Witte culture: A relevant role of the thiol moiety in lymphoid-lineage differentiation // Exp. Cell Res. – 1995. – V. 217. – N 2. – P.395-403.

667. Salasznyk R.M., Williams W.A., Boskey A., Batorsky A., Plopper G.E. Adhesion to vitronectin and collagen I promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells // J. Biomed. Biotechnol. – 2004. – N 1. – P. 24-34.

668. Salem H.K., Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status // Stem Cells. – 2010. – V. 28. – N 3. – P. 585-596.

669. Salvatori G., Lattanzi L., Coletta M., Aguanno S., Vivarelli E., Kelly R., Ferrari G., Harris A.J., Mavilio F., Molinaro M., Cossu G. Myogenic conversion of mammalian fibroblasts induced by differentiating muscle cells // J Cell Sci. – 1995. – V.108. – Pt 8. – P. 2733-2739.

670. Samama B., Boehm N. Reelin immunoreactivity in lymphatics and liver during development and adult life // Anat. Record. Part A. – 2005. – V. 285. – N 1. – P. 595-599.

671. Sasaki M., Abe R., Fujita Y., Ando S., Inokuma D., Shimizu H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type // J. Immunol. -2008. - V. 180. - N 4. - P. 2581-2587.

672. Sasaki K., Sonoda Y. Histometrical and three-dimensional analyses of liver hematopoiesis in the mouse embryo // Arch. Histol. Cytol. – 2000. – V. 63. – N 2. – P. 137-146.

673. Sato Y., Araki H., Kato J., Nakamura K., Kawano Y., Kobune M., Sato T., Miyanishi K., Takayama T., Takahashi M., Takimoto R., Iyama S., Matsunaga T., Ohtani S., Matsuura A., Hamada

H., Niitsu Y. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver differentiated into human hepatocytes without fusion // Blood. -2005. - V. 106. - N 2. - P. 756-763.

674. Scavo L.M., Karas M., Murray M., Leroith D. Insulin-like growth factor-I stimulates both cell growth and lipogenesis during differentiation of human mesenchymal stem cells into adipocytes // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2004. – V. 89. – N 7. – P. 3543-3553.

675. Schenk S., Mal N., Finan A., Zhang M., Kiedrowski M., Popovic Z., McCarthy P.M., Penn M.S. Monocyte chemotactic protein-3 is a myocardial mesenchymal stem cell homing factor // Stem Cells. – 2007. – V. 25. – N 1. – P. 245-251.

676. Schmelzer E., Zhang L., Bruce A., Wauthier E., Ludlow J., Yao H.L., Moss N., Melhem A., McClelland R., Turner W., Kulik M., Sherwood S., Tallheden T., Cheng N., Furth M.E., Reid L.M. Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors // J. Exp. Med. – 2007. – V. 204. – N 8. – P. 1973-1987.

677. Schofield R. The relationship between the spleen colonyforming cell and the haemopoietic stem cell // Blood Cells. – 1978. – V. 4. – N 1-2. – P. 7-25.

678. Scofield R. Standartization of procedures for ectopic marrow grafting: I. Influence of sex of recipient // Exp. Hematol. – 1986. – V. 14. – N 1. – P. 66-71.

679. Scholzen T., Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown // J. Cell. Physiol. – 2000. – V. 182. - N 3. – P. 311-322.

680. Schor S.L., Ellis I., Dolman C., Banyard J., Humphries M.J., Mosher D.F., Grey A.M., Mould A.P., Sottile J., Schor A.M. Substratum-dependent stimulation of fibroblast migration by the gelatin-binding domain of fibronectin // J. Cell Sci. – 1996. – V. 109. – Pt 10. – P. 2581-2590.

681. Schultz S.S., Abraham S., Lucas P.A. Stem cells isolated from adult rat muscle differentiate across all three dermal lineages // Wound Repair Regen. – 2006. – V. 14. – N 2. – P. 224-231.

682. Schwartz R. E., Reyes M., Koodie L., Jiang Y., Blackstad M., Lund T., Lenvik T., Johnson S., Hu W. S., Verfaillie C. M. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells // J. Clin. Invest. – 2002. – V. 109. – N 10. – P. 1291-1302.

683. Schweitzer K.M., Dräger A.M., van der Valk P., Thijsen S.F., Zevenbergen A., Theijsmeijer A.P., van der Schoot C.E., Langenhuijsen M.M. Constitutive expression of E-selectin and

vascular cell adhesion molecule-1 jn endothelial cells of hematopoietic tissues // Am. J. Pathol. – 1996. – V. 148. – N 1. – P. 165-175.

684. Scutt A., Bertram P. Bone marrow cells are targets for the anabolic actions of prostaglandin E2 on bone: induction of a transition from nonadherent to adherent osteoblasts precursors // J. Bone Miner. Res. – 1995. – V. 10. – N 3. – P. 474-487.

685. Seib F.P., Prewitz M., Werner C., Bornhäuser M. Matrix elasticity regulates the secretory profile of human bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2009. – V. 389. – N 4. – P. 663-667.

686. Seifert M., Stolk M., Polen Z.D., Volk H.D. Detrimental effects of rat mesenchymal stromal cell pre-treatment in a model of acute kidney rejection // Front. Immunol. – 2012. – V. 3. – P. 202. – doi: 10.3389/fimmu.2012.00202.

687. Seki M., Kameoka J., Takahashi S., Harigae H., Yanai N., Obinata M., Sasaki T. Identification of tenascin-C as a key molecule determining stromal cell-dependent erythropoiesis // Exp. Hematol. – 2006. – V. 34. – N 4. – P. 519-527.

688. Sekiya I., Larson B.L., Smith J.R., Pochampally R., Ciu J.-G., Prockop D.J. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: Conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality // Stem Cells. -2002 (a). -V. 20. - N. 6. - P. 530-541.

689. Sekiya I., Vuoristo J.T., Larson B.L., Prockop D.J. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. -2002 (b). -V.99. - N7. - P.4397-4402.

690. Sensebe L., Deschaseaux M., Li J., Herve P., Charbord P. The broad spectrum of cytokine gene expression by myoid cells from the human marrow microenvironment // Stem Cells. -1997. - V.15. - N 2. - P. 133-143.

691. Seol Y.J., Kim K.H., Park Y.J., Lee Y.M., Ku Y., Rhyu I.C., Lee S.J., Han S.B., Chung C.P.Osteogenic effects of bone-morphogenetic-protein-2 plasmid gene transfer // Biotechnol. Appl. Biochem. – 2008. – V. 49. - Pt 1. – P. 85-96.

692. Serakinci N., Graakjaer J., Kolvraa S. Telomere stability and telomerase in mesenchymal stem cells // Biochimie. – 2008. – V. 90. – N 1. – P. 33-40.

693. Seruya M., Shah A., Pedrotty D., du Laney T., Melgiri R., McKee J.A., Young H.E., Niklason L.E. Clonal population of adult stem cells: life span and differentiation potential // Cell Transplant. – 2004. – V. 13. – N 2. – P. 93-101.

694. Seshi B., Kumar S., Sellers D. Human bone marrow stromal cell: coexpression of markers specific for multiple mesenchymal cell lineages // Blood Cells Mol. Dis. – 2000. – V. 26. – N 3. – P. 234-246.

695. Shahdadfar A., Frønsdal K., Haug T., Reinholt F.P., Brinchmann J.E. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability // Stem Cells. – 2005. – V. 23. – N 9. – P. 1357-1366.

696. Shanti R.M., Li W.-J., Nesti L.J., Wang X., Tuan R.S. Adult mesenchymal stem cells: biological properties, characteristics, and applications in maxillofacial surgery J. Oral Maxillofac. Surg. – 2007. – V. 65. – N 8. – P. 1640-1647.

697. Shi D., Reinecke H., Murry C.E., Torok-Storb B. Myogenic fusion of human bone marrow stromal cells, but not hematopoietic cells Blood. – 2004. – V. 104. – N 1. – P. 290-294.

698. Shi M., Zhang Z., Xu R., Lin H., Fu J., Zou Z., Zhang A., Shi J., Chen L., Lv S., He W., Geng H., Jin L., Liu Z., Wang F.S. Human mesenchymal stem cell transfusion is safe and improves liver function in acute-on-chronic liver failure patients // Stem Cells Transl. Med. – 2012. – V 1. – N 10. – P. 725-731.

699. Shi X.-L., Qiu Y.-D., Li Q., Xie T., Zhu Z.H., Chen L.L., Li L., Ding Y.T. Hepatocytelike cells from directed differentiation of mouse bone marrow cells in vitro // Acta Pharmacol. Sin. – 2005. – V. 26. – N 4. – P. 469-476.

700. Shi X.M., Blair H.C., Yang X., McDonald J.M., Cao X. Tandem repeat of C/EBP binding sites mediates PPAR gamma2 gene transcription in glucocorticoid-induced adipocytes differentiation // J. Cell. Biochem. – 2000. – V. 76. – N 3. – P. 518-527.

701. Shin C.S., Lecanda F., Sheikh S., Weitzmann L., Cheng S.L., Civitelli R. Relative abundance of different cadherins defines differentiation of mesenchymal precursors into osteogenic, myogenic, or adipogenic pathways // J. Cell. Biochem. – 2000. – V. 78. – N 4. – P. 566-577.

702. Shohei T. The mechanism of dNTP-unbalanced cell death induced by 5-fluorouracil and its derivates // 13th Symp. Nucl. Acids Chem. Osaka. Nov. 6th-8th. 1985. / Oxford, Wash. D.C., 1985. – P. 245.

703. Shu S.N., Wei L., Wang J.H., Zhan Y.T., Chen H.S., Wang Y. Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells // World J. Gastroenterol. – 2004. – V. 10. – N 19. – P. 2818-2822.

704. Siegel G., Krause P., Wöhrle S., Nowak P., Ayturan M., Kluba T., Brehm B.R., Neumeister B., Köhler D., Rosenberger P., Just L., Northoff H., Schäfer R. Bone marrow-derived human mesenchymal stem cells express cardiomyogenic proteins but do not exhibit functional cardiomyogenic differentiation potential // Stem Cells Dev. – 2012. – V. 21. – N 13. – P. 2457-2470.

705. Signore M., Cerio A.M., Boe A., Pagliuca A., Zaottini V., Schiavoni I., Fedele G., Petti S., Navarra S., Ausiello C.M., Pelosi E., Fatica A., Sorrentino A., Valtieri M. Identity and ranking of colonic mesenchymal stromal cells // J. Cell. Physiol. – 2012. – V. 227. – N 9. – P. 3291-3300.

706. Siler U., Seiffert M., Puch S., Richards A., Torok-Storb B., Müller C.A., Sorokin L., Klein G. Characterization and functional analysis of laminin isoforms in human bone marrow // Blood. – 2000. – V. 96. – N 13. – P. 4194-4203.

707. Silva A.C., Percegona L.S., França A.L., Dos Santos T.M., Perini C.C., González P., Rebelatto C.L., Câmara N.O., Aita C.A. Expression of pancreatic endocrine markers by mesenchymal stem cells from human adipose tissue // Transplant. Proc. – 2012. – V. 44. – N 8. – P. 2495-2496.

708. Silva G.V., Litovsky S., Assad J.A., Sousa A.L., Martin B.J., Vela D., Coulter S.C., Lin J., Ober J., Vaughn W.K., Branco R.V., Oliveira E.M., He R., Geng Y.J., Willerson J.T., Perin E.C. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enchance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model // Circulation. – 2005. – V. 111. – N 2. – P. 150-156.

709. Silva W.A.Jr., Covas D.T., Panepucci R.A., Proto-Siqueira R., Siufi J.L.C., Zanette D.L., Santos A.R.D., Zago M.A. The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells // Stem Cells. – 2003. – V. 21. – N 6. – P. 661-669.

710. da Silva Meirelles L., Chagastelles P.C., Nardi N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues // J. Cell Sci. – 2006. – V. 119. - Pt 11. – P. 2204-2213.

711. Simmons P.J., Masinovsky B., Longenecker B.M., Berenson R., Torok - Storb B., Gallatin W.M. Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells // Blood. – 1992. – V. 80. - N 2. – P. 388-395.

712. Singaravelu K., Padanilam B.J. In vitro differentiation of MSC into cells with a renal tubular epithelial-like phenotype // Ren. Fail. -2009. - V. 31. - N 6. - P. 492-502.

713. Singer J.W., Charbord P., Keating A., Nemunaitis J., Raugi G., Wight T.N., Lopez J.A., Roth G.J., Dow L.W., Fialkow P.J. Simian virus 40-transformed adherent cells from human long-term

marrow cultures: cloned cell lines produce cells with stromal and hematopoietic characteristics // Blood. – 1987. – V. 70. – N 2. – P. 464-474.

714. Singer J.W., Keating A., Cuttner J., Gown A.M., Jacobson R., Killen P.D., Moohr J.W., Najfeld V., Powell J., Sanders J. Evidence for a stem cell common to hematopoiesis and its in vitro microenvironment: studies of patients with clonal hematopoietic neoplasia // Leuk. Res. – 1984. – V. 8. – N 4. – P. 535-545.

715. Singh D., Nayak V., Kumar A. Proliferation of myoblast skeletal cells on threedimensional supermacroporous cryogels // Int. J. Biol. Sci. – 2010. – V. 6. – N 4. – P. 371-381.

716. Smith J.R., Pochampally R., Perry A., Hsu S.C., Prockop D.J. Isolation of a highly clonogenic and multipotential subfraction of adult stem cells from bone marrow stroma // Stem Cells. -2004. - V. 22. - N 5. - P. 823-831.

717. Sogo Y., Ito A., Matsuno T., Oyane A., Tamazawa G., Satoh T., Yamazaki A., Uchimura E., Ohno T. Fibronectin-calcium phosphate composite layer on hydroxyapatite to enhance adnesion, cell spread and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro // Biomed. Mater. -2007. - V. 2. - N 2. - P. 116-123.

718. Solchaga L.A., Penick K., Porter J.D., Goldberg V.M., Caplan A.I., Welter J.F. FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells // J. Cell. Physiol. – 2005. – V. 203. – N 2. – P. 398-409.

719. Soleimani M., Nadri S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow // Nat. Protoc. -2009. - V. 4. - N 1. - P. 102-106.

720. Soleimani M., Nadri S., Salehi M., Sobhani A., Hajarizadeh A. Characterization of fibroblast-like cells from the rat olfactory bulb // Int. J. Dev. Biol. – 2008. – V. 52. – N 7. – P. 979-984.

721. Solursh M. Formation of cartilage tissue in vitro // J. Cell. Biochem. – 1991. – V. 45. –N 3. –P. 258-260.

722. Song H., Chang W., Lim S., Seo H.-S., Shim C.Y., Park S., Yoo K.-J., Kim B.-S., Min B.-H., Lee H., Jang Y., Chung N., Hwang K.-C. Tissue transglutaminase is essential for integrin-mediated survival of bone marrow-derived mesenchymal stem cells // Stem Cells. – 2007. – V. 25. – N 6. – P. 1431-1438.

723. Song S., Song S., Zhang H., Cuevas J., Sanchez-Ramos J. Comparison of neuron-like cells derived from bone marrow stem cells to those differentiated from adult brain neural stem cells // Stem Cells Dev. -2007. - V. 16. - N 5. - P. 747-756.

724. Spagnoli A., Longobardi L., O'Rear L. Cartilage disorders: potential therapeutic use of mesenchymal stem cells // Endocr. Dev. – 2005. – V. 9. – P. 17-30.

725. Spees J.L., Olson S.D., Ylostalo J., Lynch P.J., Smith J., Perry A., Peister A., Wang M.Y., Prockop D.J. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2003. – V. 100. – N 5. – P. 2397-2402.

726. Spiegelman B.M., Ginty C.A. Fibronectin modulation of cell shape and lipogenic gene expression in 3T3-adipocytes // Cell. – 1983. – V. 35. – N 3. – Pt 2. – P. 657-666.

727. Sreerekha P.R., Divya P., Krishnan L.K. Adult stem cell homing and differentiation in vitro on composite fibrin matrix // Cell Prolif. – 2006. – V. 39. – N 4. – P. 301-312.

728. Srikanth G.V.N., Tripathy N.K., Nityanand S. Fetal cardiac mesenchymal stem cells express embryonal markers and exhibit differentiation into cells of all three germ layers // World J. Ctem Cells. -2013. - V. 5. - N 1. - P. 26-33.

729. Stagg J., Pommey S., Eliopoulos N., Galipeau J. Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell // Blood. – 2006. – V. 107. – N 6. – P. 2570-2577.

730. Stein G. S., Lian J. B. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype // Endocr. Rev. – 1993. – V. 14. – N 4. – P. 424-442.

731. Stenderup K., Justesen J., Clausen C., Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerate senescence of bone marrow stromal cells // Bone. – 2003. – V. 33. – N 6. – P. 919-926.

732. Styner M., Meyer M.B., Galior K., Case N., Xie Z., Sen B., Thompson W.R., Pike J.W., Rubin J. Mechanical strain downregulates C/EBPβ in MSC and decreases endoplasmic reticulum stress // PLoS One. – 2012. – V. 7. – N 12. – P. e51613. - doi: 10.1371/journal.pone.0051613.

733. Sudo K., Kanno M., Miharada K., Ogawa S., Hiroyama T., Saijo K., Nakamura Y. Mesenchymal progenitors able to differentiate into osteogenic, chondrogenic, and/or adipogenic cells

in vitro are present in most primary fibroblast-like cell populations // Stem Cells. – 2007. – V. 25. – N 7. – P. 1610-1617.

734. Sugimoto A., Yamamoto M., Suzuki M., Inoue T., Nakamura S., Motoda R., Yamasaki F., Orita K. Delta-4 Notch ligand promotes erythroid differentiation of human umbilical cord blood CD34+ cells // Exp. Hematol. – 2006. – V. 34. – N 4. – P. 424-432.

735. Sugiyama D., Inoue-Yokoo T., Fraser S.T., Kulkeaw K., Mizuochi C., Horio Y. Embryonic regulation of the mouse hematopoietic niche // The Scientific World Journal. – 2011 (a). – V. 11. – P. 1770-1780.

736. Sugiyama D., Kulkeaw K., Mizuochi C., Horio Y., Okayama S. Hepatoblasts comprise a niche for fetal liver erythropoiesis through cytokine production // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2011 (b). – V. 410. – N 2. – P. 301-306.

737. Sugiyama T., Nagasawa T. Bone marrow niches for hematopoietic stem cells and immune cells // Inflamm. Allergy Drug Targets. – 2012. – V. 11. – N 3. – P. 201-206.

738. Sun L., Zhang T., Lan X., Du G. Effects of stem cell therapy on left ventricular remodeling after acute myocardial infarction: a meta-analysis // Clin. Cardiol. – 2010. – V. 33. – N 5. – P. 296-302.

739. Sun S., Guo Z., Xiao X., Liu B., Liu X., Tang P.-H., Mao N. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method // Stem Cells. – 2003. – V. 21. – N 5. – P. 527-535.

740. Suniara R.K., Jenkinson E.J., Owen J.J. An essential role for thymic mesenchyme in early T cell development // J. Exp. Med. – 2000. – V. 191. – N 6. – P. 1051-1056.

741. Suzuki H., Taguchi T., Tanaka H., Kataoka H., Li Z., Muramatsu K., Gondo T., Kawai S. Neurospheres induced from bone marrow stromal cells are multipotent for differentiation into neuron, astrocyte, and oligodendrocyte phenotypes // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2004. – V. 322. – N 3. – P. 918-922.

742. Szabo E., Rampalli S., Risueño R.M., Schnerch A., Mitchell R., Fiebig-Comyn A., Levadoux-Martin M., Bhatia M. Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors // Nature. – 2010. – V. 468. – N 7323. – P. 521-528.

743. Szade K., Bukowska-Strakova K., Nowak W.N., Szade A., Kachamakova-Trojanowska N., Zukowska M., Jozkowicz A., Dulak J. Murine bone marrow Lin⁻Sca-1⁺CD45⁻ very small

embryonic-like (VSEL) cells are heterogeneous population lacking Oct-4A expression // PloS One. – 2013. – V. 8. – N 5. – P. e63329. – doi: 10.1371/journal.pone.0063329.

744. Taichman R.S.,Reilly M.J., Verma R.S., Emerson S.G. Augmented production of interleukin-6 by normal human osteoblasts in response to CD34+ hematopoietic bone marrow cells in vitro // Blood. – 1997. – V. 89. - N 4. – P. 1165-1172.

745. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // Cell. -2006. - V. 126. - N 4. - P. 663-676.

746. Takashima Y., Era T., Nakao K., Kondo S., Kasuga M., Smith A.G., Nishikawa S. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation // Cell. – 2007. – V. 129. – N 7. – P. 1377-1388.

747. Talens-Visconti R., Bonora A., Jover R., Mirabet V., Carbonell F., Castell J.V., Gómez-Lechón M.J. Human mesenchymal stem cells from adipose tissue: Differentiation into hepatic lineage // Toxicol. In Vitro. – 2007. – V. 21. – N 2. – P. 324-329.

748. Tamama K., Fan V.H., Griffith L.G., Blair H.C., Wells A. Epidermal growth factor as a candidate for ex vivo expansion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells // Stem Cells. – 2006. – V. 24. – N 3. – P. 686-695.

749. Tamiolakis D., Venizelos I., Nikolaidou S., Jivanakis T. Normal development of fetal hepatic haematopoiesis during the second trimester of gestation is upregulated by fibronectin expression in the stromal cells of the portal triads // Rev. Esp. Enferm. Dig. -2007. - V.99. - N 10. - P.576-580.

750. Tan Q., Lui P.P., Rui Y.F., Wong Y.M. Comparison of potentials of stem cells isolated from tendon and bone marrow for musculoskeletal tissue engineering // Tissue Eng. Part A. – 2012. 0 V. 18. – N 7-8. – P. 840-851.

751. Tanaka-Douzono M., Suzu S., Yamada M., Wakimoto N., Hayasawa H., Hatake K., Motoyoshi K. Detection of murine adult bone marrow stroma-initiating cells in Lin⁻ c-fms⁺ c-kit^{low} VCAM-1⁺ cells // J. Cell. Physiol. – 2001. – V. 189. – N 1. – P. 45-53.

752. Tang Q.Q., Otto T.C., Lane M.D. Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocytes lineage // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2004. – V. 101. – N 26. – P. 9607-9611.

753. Tarnowski M., Szydło A., Anioł J., Koryciak-Komarska H., Lesiak M., Gutmajster E., Sieroń A.L., Kusz D. Optimization of genetic engineering and homologous recombination of collagen

type I genes in rat bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) // Cell Reprogram. – 2010. – V. 12. – N 3. – P. 275-282.

754. Tavassoli M. Hemopoiesis in ectopically implanted bone marrow // Kroc. Found. Ser. – 1984. – V. 18. – P. 31-54.

755. Tavassoli M., Hardy C.L. Molecular basis of homing of intravenously transplanted stem cells to the marrow // Blood. – 1990. – V. 76. - N 6. – P. 1059-1070.

756. Taylor S.M., Jones P.A. Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine // Cell. – 1979. – V. 17. – N 4. – P. 771-779.

757. Teo G.S., Ankrum J.A., Martinelli R., Boetto S.E., Simms K., Sciuto T.E., Dvorak A.M., Karp J.M., Carman C.V. Mesenchymal stem cells transmigrate between and directly through tumor necrosis factor- α -activated endothelial cells via both leukocyte-like and novel mechanisms // Stem Cells. – 2012. – V. 30. – N 11. – P. 2472-2486.

758. Teplyuk N.M., Haupt L.M., Ling L., Dombrowski C., Mun F.K., Nathan S.S., Lian J.B., Stein J.L., Stein G.S., Cool S.M., van Wijnen A.J. The osteogenic transcription factor Runx2 regulates components of the fibroblast growth factor/proteoglycan signaling axis in osteoblasts // J. Cell Biochem. – 2009. – V. 107. – N 1. – P. 144-154.

759. Terrace J.D., Currie I.S., Hay D.C., Masson N.M., Anderson R.A., Forbes S.J., Parks R.W., Ross J.A. Progenitor cell characterization and location in the developing human liver // Stem Cells Dev. – 2007. – V. 16. – N 5. – P. 771-778.

760. Timens W., Kamps W.A. Hemopoiesis in human fetal and embryonic liver // Microsc. Res. Tech. – 1997. – V. 39. – N 5. – P. 387-397.

761. Tio M., Tan K.H., Lee W., Wang T.T., Udolph G. Roles of db-cAMP, IBMX and RA in aspects of neural differentiation of cord blood derived mesenchymal-like stem cells // PLoS One. – 2010. – V. 5. – N 2. – P. e9398. – doi: 10.1371/journal.pone.0009398.

762. Tokalov S.V., Gruener S., Schindler S., Iagunov A.S., Baumann M., Abolmaali N.D. A number of bone marrow mesenchymal stem cells but neither phenotype nor differentiation capacities changes with age of rats // Mol. Cells. -2007. - V. 24. - N 2. - P. 255-260.

763. Toksoz D., Zsebo K.M., Smith K.A., Hu S., Brankow D., Suggs S.V., Martin F.H., Williams D.A. Support of human hematopoiesis in long - term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane - bound and secreted forms of the human homolog

of the steel gene product, stem cell factor // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1992. – V. 89. - N 16. – P. 7350-7354.

764. Tolar J., Nauta A.J., Osborn M.J., Panoskaltsis Mortari A., McElmurry R.T., Bell S., Xia L., Zhou N., Riddle M., Schroeder T.M., Westendorf J.J., McIvor R.S., Hogendoorn P.C., Szuhai K., Oseth L., Hirsch B., Yant S.R., Kay M.A., Peister A., Prockop D.J., Fibbe W.E., Blazar B.R. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells // Stem Cells. – 2007. – V. 25. – N 2. – P. 371-379.

765. Tomita S., Nakatani T., Fukuhara S., Morisaki T., Yutani C., Kitamura S. Bone marrow stromal cells contract synchronously with cardiomyocytes in a coculture system // Jpn. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. – 2002. – V. 50. – N8. – P. 321-324.

766. Tondreau T., Lagneaux L., Dejeneffe M., Massy M., Mortier C., Delforge A., Bron D. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation // Differentiation. – 2004. – V. 72. – N 7. – P. 319-326.

767. Torii I., Morikawa S., Nakano A., Morikawa K. Establishment of a human preadipose cell line, HPB-AML-I: Refractory to PPARγ-mediated adipogenic stimulation // J. Cell Physiol. – 2003. – V. 197. – N 1. – P. 42-52.

768. Tormin A., Li O., Brune J.C., Walsh S., Schütz B., Ehinger M., Ditzel N., Kassem M., Scheding S. CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization // Blood. – 2011. – V. 117. – N 19. – P. 5067-5077.

769. Tremain N., Korkko J., Ibberson D., Kopen G.C., Di Girolamo C., Phinney D.G. Micro SAGE analysis of 2,353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNAs of multiple cell lineages // Stem Cells. – 2001. - V. 19. - N 5. – P. 408-418.

770. Tropel P., Noel D., Platet N., Legrand P., Benabid A.L., Berger F. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow // Exp. Cell Res. – 2004. – V. 295. – N 2. – P. 395-406.

771. Trounson A., Thakar R.G., Lomax G., Gibbons D. Clinical trials for stem cell therapies // BMC Med. – 2011. – V. 9. – P. 52. – doi: 10.1186/1741-7015-9-52.

772. Tsuchiyama J., Mori M., Okada S. Murine spleen stromal cell line SPY3-2 maintains long-term hematopoiesis in vitro // Blood. – 1995. – V. 85. - N 11. – P. 3107-3116.
773. Tsutsumi S., Shimazu A., Miyazaki K., Pan H., Koike C., Yoshida E., Takagishi K., Kato Y. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2001. – V. 288. – N 2. – P. 413-419.

774. Tuli R., Seghatoleslami M.R., Tuli S., Howard M.S., Danielson K.G., Tuan R.S. p38 MAP kinase regulation of AP-2 binding in TGF-beta1-stimulated chondrogenesis of human trabecular bone-derived cells // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2002. – V. 961. – P. 172-177.

775. Ueno T., Nakashima A., Doi S., Kawamoto T., Honda K., Yokoyama Y., Doi T., Higashi Y., Yorioka N., Kato Y., Kohno N., Masaki T. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental peritoneal fibrosis by suppressing inflammation and inhibiting TGF- β 1 signaling // Kidney Int. – 2013. – V. 84. – N 2. – P. 297-307.

776. De Ugarte D.A., Alfonso Z., Zuk P.A., Elbarbary A., Zhu M., Ashjian P., Benhaim P., Hedrick M.H., Fraser J.K. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multilineage cells from adipose tissue and bone marrow // Immunol. Lett. –2003. – V. 89. – N 2-3. – P. 267-270.

777. Ulyanova T., Scott L.M., Priestley G.V., Jiang Y., Nakamoto B., Koni P.A., Papayannopoulou T. VCAM-1 expression in adult hematopoietic and nonhematopoietic cells is controlled by tissue-inductive signals and reflects their developmental origin // Blood. – 2005. – V. 106. - N 1. – P. 86-94.

778. Umar M.H., van Griensven L.J.L.D. Mesenteric hemopoietic colonies. II. Occurrence in mice after transplantation of syngeneic normal bone marrow cells // Exp. Hematol. – 1978. – V. 6. - N 1. - P. 110-113.

779. Vacanti V., Kong E., Suzuki G., Sato K., Canty J.M., Lee T. Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture // J. Cell. Physiol. – 2005.
– V. 205. – P. 194-201.

780. Valdés F., Alvarez A.M., Locascio A., Vega S., Herrera B., Fernández M., Benito M., Nieto M.A., Fabregat I. The epithelial mesenchymal transition confers resistance to the apoptotic effects of transforming growth factor Beta in fetal rat hepatocytes // Mol. Cancer Res. – 2002. – V. 1. – N 1. – P. 68-78.

781. Van Damme A., Chuah M.K., Dell'accio F., De Bari C., Luyten F., Collen D., Vanden Driessche T. Bone marrow mesenchymal cells for haemophilia A gene therapy using retroviral vectors with modified long-terminal repeats // Haemophilia. – 2003. – V. 9. – N 1. – P. 94-103.

782. Van Den Berg D.J., Sharma A.K., Bruno E., Hoffman R. Role of members of the Wnt gene family in human hematopoiesis // Blood. – 1998. – V. 92. – N 9. – P. 3189-3202.

783. Van Den Heuvel R., Mathieu E., Schoeters G., Leppens H., Vanderborght O. Stromal cells from murine developing hemopoietic organs: comparison of colony-forming unit of fibroblasts and long-term cultures // Int. J. Dev. Biol. – 1991 (a). – V. 35. – N 1. – P. 33-41.

784. Van Den Heuvel R., Schoeters G., Leppens H., Vanderborght O. Stromal cells in longterm cultures of liver, spleen, and bone marrow at different developmental ages have different capacities to maintain GM-CFC proliferation // Exp. Hematol. – 1991 (b). – V. 19. – N 2. – P. 115-121.

785. Van Den Heuvel R.L., Versele S.R.M., Schoeters G.E.R., Vanderborght O.L.J. Stromal stem cells (CFU-F) in yolk sac, liver, spleen and bone marrow of pre- and postnatal mice // Br. J. Haematol. -1987. - V. 66. - N 1. - P. 15-20.

786. Van Overstraeten-Schlögel N., Beguin Y., Gothot A. Role of stromal-derived factor-1 in the hematopoietic-supporting activity of human mesenchymal stem cells // Eur. J. Haematol. – 2006. – V. 76. – N 6. – P. 488-493.

787. Van Zant G. Studies of hematopoietic stem cells spared by 5-fluorouracil // J. Exp. Med. – 1984. – V. 159. – N 3. – P. 679-690.

788. Varnum-Finney B., Purton L.E., Yu M., Brashem-Stein C., Flowers D., Staats S., Moore K.A., Le Roux I., Mann R., Gray G., Artavanis-Tsakonas S., Bernstein I.D. The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells // Blood. – 1998. – V. 91. – N 11. – P. 4084-4091.

789. Versele S.R., Van Den Heuvel R.L., Schoeters G.E., Vanderborght O.L. Proliferation activity of stromal stem cells (CFU-f) from hemopoietic organs of pre- and postnatal mice // Radiat. Res. – 1987. – V. 111. – N 2. – P. 185-191.

790. Vetvicka V., Kincade P.W., Witte P.L. Effects of 5-fluorouracil on B lymphocyte lineage cells // J. Immunol. – 1986. – V. 137. – N 8. – P. 2405-2410.

791. Vidal M.A., Kilroy G.E., Johnson J.R., Lopez M.J., Moore R.M., Gimble J.M. Cell growth characteristics and differentiation frequency of adherent equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity // Vet. Surg. – 2006. – V. 35. – N 7. – P. 601-607.

792. Vishnubalaji R., Al-Nbaheen M., Kadalmani B., Aldahmash A., Ramesh T. Comparative investigation of the differentiation capability of bone-marrow- and adipose-derived mesenchymal stem cells by qualitative and quantitative analysis // Cell Tissue Res. -2012. -V. 347. -N 2. -P. 419-427.

793. Vlodavsky I., Bar-Shavit R., Ishai-Michaeli R., Bashkin P., Fuks Z. Extracellular sequestration and release of fibroblast growth factor: a regulatory mechanism? // Trends Biochem. Sci. – 1991. – V. 16. – N 7. – P. 268-271.

794. Vuillet -Gaugler M.H., Breton - Gorius J., Vainchenker W., Guichard J., Leroy C., Tchernia G., Coulombel L. Loss of attachment to fibronectin with terminal human erythroid differentiation // Blood. – 1990. – V. 75. - N 4. – P. 865-873.

795. Wagers A.J., Weissman I.L. Plasticity of adult stem cells // Cell. – 2004. – V. 116. – N5. – P. 639-648.

796. Wagner W., Feldmann R.E. Jr, Seckinger A., Maurer M.H., Wein F., Blake J., Krause U., Kalenka A., Bürgers H.F., Saffrich R., Wuchter P., Kuschinsky W., Ho A.D. The heterogeneity of human mesenchymal stem cell preparations--evidence from simultaneous analysis of proteomes and transcriptomes // Exp. Hematol. – 2006. – V. 34. – N 4. – P. 536-548.

797. Wagner W., Roderburg C., Wein F., Diehlmann A., Frankhauser M., Schubert R., Eckstein V., Ho A.D. Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors // Stem Cells. – 2007. – V. 25. – N 10. – P. 2638-2647.

798. Wagner W., Wein F., Seckinger A., Frankhauser M., Wirkner U., Krause U., Blake J., Schwager C., Eckstein V., Ansorge W., Ho A.D. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood // Exp Hematol. – 2005. – V. 33. – N 11. – P. 1402-1416.

799. Wakitani S., Nawata M., Tensho K., Okabe T., Machida H., Ohgushi H. Repair of articular cartilage defects in the patello -femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees // J. Tissue Eng. Regen. Med. - 2007. - V. 1. - N 1. - P. 74-79.

800. Wakitani S., Saito T., Caplan A.I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine // Muscle Nerve. – 1995. – V. 18. – N 12. – P. 1417-1426.

801. Wallace S.R., Oken M.M., Lunetta K.L., Panoskaltsis-Mortari A., Masellis A.M. Abnormalities of bone marrow mesenchymal cells in multiple myeloma patients // Cancer. – 2001. – V. 91. – N 7. – P. 1219-1230.

802. Waller E.K., Olweus J., Lund-Johansen F., Huang S., Nguyen M., Guo G.-R., Terstappen L. The "Common stem cell" hypothesis reevaluated: Human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors // Blood. – 1995. – V. 85. – N 9. - P. 2422-2435.

803. Walsh S., Jordan G.R., Jefferiss C., Stewart K., Beresford J.N. High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or futher maturation of human osteoblasts precursors in vitro: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis // Rheumatology. – 2001. - V.40. - N1. - P.74-83.

804. Wan C.D., Cheng R., Wang H.B., Liu T. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model // Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int. – 2008. – V. 7. – N 1. – P. 29-33.

805. Wan C., He Q., McCaigue M., Marsh D., Li G. Nonadherent cell population of human marrow culture is a complementary source of mesenchymal stem cells (MSCs) // J. Orthop. Res. – 2006. – V. 24. – N 1. – P. 21-28.

806. Wang A., Ding X., Sheng S., Yao Z. Bone morphogenetic protein receptor in the osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells // Yonsei Med. J. – 2010. – V. 51. – N 5. – P. 740-745.

807. Wang D., Zhang H., Liang J., Li X., Feng X., Wang H., Hua B., Liu B., Lu L., Gilkeson G.S., Silver R.M., Chen W., Shi S., Sun L. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus: 4 years experience // Cell Transplant. – 2013 (a). – V. 22. – N 12. – P. 2267-2277.

808. Wang H.S., Hung S.C., Peng S.T., Huang C.C., Wei H.M., Guo Y.J., Fu Y.S., Lai M.C., Chen C.C. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord // Stem Cells. – 2004 (a). – V. 22. – N 7. – P. 1330-1337.

809. Wang H., Wang Z., Zheng X., Ding L., Zhu L., Yan H., Guo Z. Hematopoietic stem cell transplantation with umbilical cord multipotent stromal cell infusion for the treatment of aplastic anemia – a single-center experience // Cytotherapy. – 2013 (b). – V. 15. – N 9. – P. 1118-1125.

810. Wang H., Yang Y.F., Zhao L., Xiao F.J., Zhang Q.W., Wen M.L., Wu C.T., Peng R.Y., Wang L.S. Hepatocyte growth factor gene-modified mesenchymal stem cells reduce radiation-induced lung injury // Hum. Gene Ther. – 2013 (c). - V. 24. – N 3. – P. 343-353.

811. Wang J., Zhou J., Zhao Z. Experimental study of osteogenic induction of fetal mouse liver mesenchymal stem cells in vitro and their biologic attachment properties to true bone ceramic // Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi. – 2005 (a). – V. 19. – N 8. – P. 648-651.

812. Wang P.P., Wang J.H., Yan Z.P., Hu M.Y., Lau G.K., Fan S.T., Luk J.M. Expression of hepatocyte-like phenotypes in bone marrow stromal cells after HGF induction // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2004 (b). – V. 320. – N 3. – P. 712-716.

813. Wang Q., Chen Z., Piao Y. The committed differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into tenocytes // Med. J. Chin. PLA. -2005 (b). - V. 30. - N 1. - P. 47-50.

814. Wang Q.-R., Wolf N.S. Dissecting the hematopoietic microenvironment. VIII. Clonal isolation and identification of cell types in murine CFU-F colonies by limiting dilution // Exp. Hematol. – 1990. – V. 18. – N 4. – P. 355-359.

815. Wang X.Y., Lan Y., He W.Y., Zhang L., Yao H.Y., Hou C.M., Tong Y., Liu Y.L., Yang G., Liu X.D., Yang X., Liu B., Mao N. Identification of mesenchymal stem cells in aorta-gonadmesonephros and yolk sac of human embryos // Blood. – 2008. – V. 111. – N 4. – P. 2436-2443.

816. Wang X.Y., Liu B., Yuan C.H., Yao H.Y., Mao N. Effect of bone marrow mesenchymal stem cells on hematopoietic differentiation of murine embryonic stem cells // Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. – 2003. – V. 11. – N 4. – P. 329-334.

817. Wang Y., Volloch V., Pindrus M.A., Blasioli D.J., Chen J., Kaplan D.L. Murine osteoblasts regulate mesenchymal stem cells via WNT and cadherin pathways: mechanism depends on cell-cell contact mode // J. Tissue Eng. Regen. Med. – 2007. - V. 1. - N 1. - P. 39-50.

818. Wang Z., Song J., Taichman R.S., Krebsbach P.H. Ablation of proliferating marrow with
5-fluorouracil allows partial purification of mesenchymal stem cells // Stem Cells. – 2006. – V. 24. – N
6. – P. 1573-1582.

819. Warejcka D.J., Harvey R., Taylor B.J., Young H.E., Lucas P.A. A population of cells isolated from rat heart capable of differentiating into several mesodermal phenotypes // J. Surg. Res. – 1996. – V. 62. – N 2. – P. 233-242.

820. Warnke P.H., Springer I.N., Wiltfang J., Acil Y., Eufinger H., Wehmöller M., Russo P.A., Bolte H., Sherry E., Behrens E., Terheyden H. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man // Lancet. – 2004. – V. 364. – N 9436. – P. 766-770.

821. Wei K.H., Pei G.X., Zheng L. The effects of dexamethasone on biological characteristics of bone marrow stromal cells // Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi. – 2001. – V. 15. –N 4. – P. 232-234.

822. Weinstein R., Riordan M.A., Wenc K., Kreczko S., Zhou M., Dainiak N. Dual role of fibronectin in hematopoietic differentiation // Blood. – 1989. – V. 73. – N 1. – P. 111-116.

823. Weiss S., Hennig T., Bock R., Steck E., Richter W. Impact of growth factors and PTHrP on early and late chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells // J. Cell. Physiol. – 2010. – V. 223. – N 1. – P. 84-93.

824. Wenceslau C. V., Miglino M.A., Martins D.S., Ambrósio C.E., Lizier N.F., Pignatari G.C., Kerkis I. Mesenchymal progenitor cells from canine fetal tissues: yolk sac, liver, and bone marrow // Tissue Eng. Part A. – 2011. – V. 17. – N 17-18. – P. 2165-2176.

825. Weng J.Y., Du X., Geng S.X., Peng Y.W., Wang Z., Lu Z.S., Wu S.J., Luo C.W., Guo R., Ling W., Deng C.X., Liao P.J., Xiang A.P. Mesenchymal stem cell as salvage treatment for refractory chronic GVHD // Bone Marrow Transplant. – 2010. – V. 45. – N 12. – P. 1732-1740.

826. Wexler S.A., Donaldson C., Denning-Kendall P., Rice C., Brandley B., Hows J.M. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not // Br. J. Haematol. -2003. - V. 121. - N 2. - P. 368-374.

827. Wieczorek G., Steinhoff C., Schulz R., Scheller M., Vingron M., Ropers H.H., Nuber U.A. Gene expression profile of mouse bone marrow stromal cells determined by cDNA microarray analysis // Cell Tissue Res. – 2003. – V. 311. – N 2. – P. 227-237.

828. Wineman J., Moore K., Lemischka I., Muller-Sieburg C. Functional heterogeneity of the hematopoietic microenvironment: Rare stromal elements maintain long - term repopulating stem cell // Blood. – 1996. – V. 87. – N 10. – P. 4082-4090.

829. Winkler T., von Roth P., Radojewski P., Urbanski A., Hahn S., Preininger B., Duda G.N., Perka C. Immediate and delayed transplantation of mesenchymal stem cells improve muscle force after skeletal muscle injury in rats // J. Tissue Eng. Regen. Med. – 2012. – V. 6. – Suppl. 3. – P. s60-s67. 830. Wise C.J., Watt D.J., Jones G.E. Conversion of dermal fibroblasts to a myogenic lineage is induced by a soluble factor derived from myoblasts // J Cell Biochem. – 1996. – V. 61. – N 3. – P.363-374.

831. Wislet-Gendebien S., Hans G., Leprince P., Rigo J.M., Moonen G., Rogister B. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype // Stem Cells. – 2005. – V. 23. – N 3. – P. 392-402.

832. Wittig O., Paez-Cortez J., Cardier J.E. Liver sinusoidal endothelial cells promote B lymphopoiesis from primitive hematopoietic cells // Stem Cells Dev. – 2010. – V. 19. – N 3. – P. 341-350.

833. Wolber F.M., Leonard E., Michael S., Orschell-Traycoff C.M., Yoder M.C., Srour E.F.
Roles of spleen and liver in development of the murine hematopoietic system // Exp. Hematol. – 2002.
- V. 30. - N 9. - P. 1010-1019.

834. Wolf N.S., Bertoncello I., Jiang D., Priestley G. Developmental hematopoiesis from prenatal to young-adult life in the mouse model // Exp. Hematol. – 1995. – V. 23. – N 2. – P. 142-146.

835. Woodbury D., Schwarz E.J., Prockop D.J., Black I.B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons // J. Neurosci. Res. – 2000. – V. 61. – N 4. – P. 364-370.

836. Worster A.A., Brower-Toland B.D., Fortier L.A., Bent S.J., Williams J., Nixon A.J. Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor-beta1 in monolayer and insulin-like growth factor-1 in a three-dimensional matrix // J. Orthop. Res. -2001. - V. 19. - N 4. - P. 738-749.

837. Woods A., Couchman J.R., Johanson S., Höök M. Adhesion and cytoskeletal organization of fibroblasts in response to fibronectin fragments // EMBO J. – 1986. – V. 5. – N 4. – P. 665-670.

838. Xiang J., Tang J., Song C., Yang Z., Hirst D.G., Zheng Q.J., Li G. Mesenchymal stem cells as a gene therapy carrier for treatment of fibrosarcoma // Cytotherapy. – 2009. – V. 11. – N 5. – P. 516-526.

839. Xiao Y., Jiang Z.J., Pang Y., Li L., Gao Y., Xiao H.W., Li Y.H., Zhang H., Liu Q. Efficacy and safety of mesenchymal stromal cell treatment from related donors for patients with refractory aplastic anemia // Cytotherapy. – 2013. – V. 15. – N 7. – P. 760-766.

840. Xu F., Shi J., Yu B., Ni W., Wu X., Gu Z. Chemokines mediate mesenchymal stem cell migration toward gliomas in vitro // Oncol. Rep. – 2010. – V. 23. – N 6. – P. 1561-1567.

841. Xu W., Zhang X., Qian H., Zhu W., Sun X., Hu J., Zhou H., Chen Y. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro // Exp.
Biol. Med. - 2004. - V. 229. - N 7. - P. 623-631.

842. Yamada K.M., Humphries M.J., Hasegawa T., Hasegawa E., Olden K., Chen W.-T., Akiyama S.K. Fibronectin: molecular approaches to analyzing cell interactions with the extracellular matrix // The cell in contact. Adhesions and junctions as morphogenetic determinants / Eds. Edelman G.M., Thiery J.-P. – N-Y.: John Wiley & Sons, 1986. – P. 303-332.

843. Yamada M., Suzu S., Tanaka-Douzono M., Wakimoto N., Hatake K., Hayasawa M., Motoyoshi K. Effect of cytokines on the proliferation/differentiation of stroma-initiating cells // J. Cell. Physiol. – 2000. – V. 184. – N 3. – P. 351-355.

844. Yamada Y., Ueda M., Hibi H., Baba S. A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma using tissue engineering technology: A clinical case report // Int. J. Periodontics Restorative Dent. -2006. - V. 26. - N 4. - P. 363-369.

845. Yamaguchi A., Komori T., Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1 // Endocr. Rev. – 2000. – V. 21. – N 4. – P. 393-411.

846. Yan Z.-J., Wang Q.-R., McNiece I.K., Wolf N.S. Dissecting the hematopoietic microenvironment. VII. The production of an autostimulatory factor as well as a CSF by unstimulated murine marrow fibroblasts // Exp. Hematol. – 1990. – V. 18. - N 4. – P. 348-354.

847. Yanai N., Matsuya Y., Obinata M. Spleen stromal cell lines selectively support erythroid colony formation // Blood. – 1989. – V. 74. - N 7. – P. 2391-2397.

848. Yanai N., Obinata M. Oncostatin m regulates mesenchymal cell differentiation and enhances hematopoietic supportive activity of bone marrow stromal cell lines // In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. -2001. - V. 37. - N 10. - P. 698-704.

849. Yang M.C., Chi N.H., Chou N.K., Huang Y.Y., Chung T.W., Chang Y.L., Liu H.C., Shieh M.J., Wang S.S. The influence of rat mesenchymal stem cell CD44 surface markers on cell growth, fibronectin expression, and cardiomyogenic differentiation on silk fibroin - Hyaluronic acid cardiac patches // Biomaterials. – 2010. – V. 31. – N 5. – P. 854-862.

850. Yang W.J., Li S.H., Weisel R.D., Liu S.M., Li R.K. Cell fusion contributes to the rescue of apoptotic cardiomyocytes by bone marrow cells // J. Cell. Mol. Med. – 2012. – V. 16. – N 12. – P. 3085-3095.

851. Ye N.-C., Chen J., Luo G.-A., Zhang R.,-L., Zhao Y.-F., Wang Y.-M. Proteomic profiling of rat bone marrow mesenchymal stem cells induced by 5-azacytidine // Stem Cells Dev. – 2006. – V. 15. – N 5. – P. 665-676.

852. Yeager A.M., Levin J., Levin F.C. The effects of 5-fluorouracil on hematopoiesis: studies of murine megakaryocyte-CFC, granulocyte-macrophage-CFC, and peripheral blood cell levels // Exp. Hematol. – 1983. – V. 11. – N 10. – P. 944-952.

853. Yee A.G., Fischbach G.D., Karnovsky M.J. Clusters of intramembranous particles on cultured myotubes at sites that are highly sensitive to acetylcholine // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1978. – V. 75. – N 6. – P.3004-3008.

854. Yen B.L., Huang H.I., Chen C.C., Jui H.Y., Ko B.S., Yao M., Shun C.T., Yen M.L., Lee M.C., Chen Y.C. Isolation of multipotent cells from human term placenta // Stem Cells. – 2005. – V. 23. – N 1. – P. 3-9.

855. Yin T., Li L. The stem cell niches in bone // J. Clin. Invest. – 2006. – V. 116. – N 5. – P. 1195-1201.

856. Yokoya S., Mochizuki Y., Natsu K., Omae H., Nagata Y., Ochi M. Rotator cuff regeneration using a bioabsorbable material with bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model // Am. J. Sports Med. -2012. - V. 40. - N. 6. - P. 1259-1268.

857. Yokoyama A., Sekiya I., Miyazaki K., Ichinose S., Hata Y., Muneta T. In vitro cartilage formation of composites of synovium-derived mesenchymal stem cells with collagen gel // Cell Tissue Res. – 2005. – V. 322. – N 2. – P. 289-298.

858. Yoo J.U., Barthel T.S., Nishimura K., Solchaga L., Caplan A.I., Goldberg V.M., Johnstone B. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells // J. Bone Joint Surg. – 1998. – V. 80. – N 12. – P. 1745-1757.

859. Yoon Y.S., Park J.S., Tkebuchava T., Luedeman C., Losordo D.W. Unexpected severe calcification after transplantation of bone marrow cells in acute myocardial infarction // Circulation. – 2004. – V. 109. – N 25. – P. 3154-3157.

860. Yoon Y.S., Wecker A., Heyd L., Park J.S., Tkebuchava T., Kusano K., Hanley A., Scadova H., Qin G., Cha D.H., Johnson K.L., Aikawa R., Asahara T., Losordo D.W. Clonally

expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction // J. Clin. Invest. – 2005. – V. 115. – N 2. – P. 326-338.

861. Yoshimura H., Muneta T., Nimura A., Yokoyama A., Koga H., Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle // Cell Tissue Res. – 2007. – V. 327. – N 3. – P. 449-462.

862. Young R.G., Butler D.L., Weber W., Caplan A.I., Gordon S.L., Fink D.J. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair // J. Orthop. Res. –1998. – V. 16. – N 4. – P. 406-413.

863. Zangi L., Rivkin R., Kassis I., Levdansky L., Marx G., Gorodetsky R. High-yield isolation, expansion, and differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells with fibrin microbeads // Tissue Eng. -2006. - V. 12. - N 8. - P. 2343-2354.

864. Zavan B., Giorgi C., Bagnara G.P., Vindigni V., Abatangelo G., Cortivo R. Osteogenic and chondrogenic differentiation: comparison of human and rat bone marrow mesenchymal stem cells cultured into polymeric scaffolds // Eur. J. Histochem. – 2007. - V. 51. - Suppl. 1. - P. 1-8.

865. Zavan B., Vindigni V., Gardin C., D'Avella D., Della Puppa A., Abatangelo G., Cortivo R. Neural potential of adipose stem cells // Discov. Med. – 2010. – V. 10. – N 50. – P. 37-43.

866. Zhang F.B., Li L., Fang B., Zhu D.L., Yang H.T., Gao P.J. Passage-restricted differentiation potential of mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2005 (a). – V. 336. – N 3. – P. 784-792.

867. Zhang H., Miao Z., He Z., Yang Y., Wang Y., Feng M. The existence of epithelial-tomesenchymal cells with the ability to support hematopoiesis in human fetal liver // Cell. Biol. Int. – 2005 (b). – V. 29. – N 3. – P. 213-219.

868. Zhang J., An Y., Gao L.N., Zhang Y.J., Jin Y., Chen F.M. The effect of aging on the pluripotential capacity and regenerative potential of human periodontal ligament stem cells // Biomaterials. -2012 (a). -V. 33. -N 29. -P. 6974-6986.

869. Zhang X., Sobue T., Hurley M.M. FGF-2 increases colony formation, PTH receptor, and IGF-1 mRNA in mouse marrow stromal cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2002. – V. 290. – N 1. – P. 526-531.

870. Zhang Y., Khan D., Delling J., Tobiasch E. Mechanisms underlying the osteo- and adipodifferentiation of human mesenchymal stem cells // The Scientific World Journal. – 2012 (b). – V. 2012. – Article ID 793823. – doi: 10.1100/2012/793823. 871. Zhang Z., Lin H., Shi M., Xu R., Fu J., Lv J., Chen L., Lv S., Li Y., Yu S., Geng H., Jin L., Lau G.K., Wang F.S. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve liver function and ascites in decompensated liver cirrhosis patients // J. Gastroenterol. Hepatol. – 2012 (c). – V. 27. – Suppl. 2. – P. 112-120.

872. Zhang Z.X., Guan L.X., Zhang K., Zhang Q., Dai L.J. A combined procedure to deliver autologous mesenchymal stromal cells to patients with traumatic brain injury // Cytotherapy. – 2008. – V. 10. – N 2. – P. 134-139.

873. Zhang Z.Y., Teoh S.H., Chong M.S., Schantz J.T., Fisk N.M., Choolani M.A., Chan J. Superior osteogenic capacity for bone tissue engineering of fetal compared with perinatal and adult mesenchymal stem cells // Stem Cells. -2009. - V. 27. - N 1. - P. 126-137.

874. Zhao X.Z., Wei L., Han M., Li L.S. Isolation, culture and multipotent differentiation of mesenchymal stem cells from human fetal livers // Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi. – 2004. – V. 12. – N 12. – P. 711-713.

875. Zheng H., Martin J.A., Duwayri Y., Falcon G., Buckwalter J.A. Impact of aging on rat bone marrow-derived stem cell chondrogenesis // J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. – 2007. – V. 62. – N 2. – P. 136-148.

876. Zheng L., Fan H.S., Sun J., Chen X.N., Wang G., Zhang L., Fan Y.J., Zhang X.D. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced by collagen-based hydrogel: an in vivo study // J. Biomed. Mater. Res. A. -2010. - V. 93. - N2. - P. 783-792.

877. Zhou D.H., Huang S.L., Wu Y.F., Wei J., Chen G.Y., Li Y., Bao R. The expansion and biological characteristics of human mesenchymal stem cells // Zhonghua Er. Ka Za Zhi. – 2003. – V. 41. – N 8. – P. 607-610.

878. Zhou S., Eid K., Glowacki J. Cooperation between TGF-beta and Wnt pathways during chondrocyte and adipocyte differentiation of human marrow stromal cells // J. Bone Miner. Res. - 2004. - V. 19. - N 3. - P. 463-470.

879. Zhou W.W., Hu J.G., Yang J.F., Lin L., Zhou X.M., Tang T. Angiogenic effect of bone marrow mesenchymal stem cells transfected with human VEGF gene on myocardial infarcts in rats // Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. -2006. - V. 31. - N 5. - P. 763-766.

880. Zhou Z., Jiang E.L., Wang M., Liu Q.G., Zhai W., Huang Y., Wang H.H., Han M.Z. Comparative study on various subpopulations in mesenchymal stem cells of adult bone marrow // Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. – 2005. – V. 13. – N 1. – P. 54-58.

881. Zhu G.R., Zhou X.Y., Lu H., Zhou J.W., Li A.P., Xu W., Li J.Y., Wang C.Y. Human bone marrow mesenchymal stem cells express multiple hematopoietic growth factors // Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. – 2003. – V. 11. – N 2. – P. 115-119.

882. Zhu H., Mitsuhashi N., Klein A., Barsky L.W., Weinberg K., Barr M.L., Demetriou A., Wu G.D. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix // Stem Cells. – 2006. – V. 24. – N 4. – P. 928-935.

883. Zhuang Y., Chen X., Xu M., Zhang L.Y., Xiang F. Chemokine stromal cell-derived factor 1/CXCL12 increases homing of mesenchymal stem cells to injured myocardium and neovascularization following myocardial infarction // Chin. Med. J. – 2009. – V. 122. – N 2. – P. 183-187.

884. Zipori D. The stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional // Stem Cells. – 2005. – V. 23. – N 6. – P. 719-726.

885. Zuba-Surma E.K., Kucia M., Rui L., Shin D.M., Wojakowski W., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. Fetal liver very small embryonic/epiblast like stem cells follow developmental migratory pathway of hematopoietic stem cells // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2009. – V. 1176. – P. 205-218.

886. Zvaifler N.J., Marinova-Mutafchieva L., Adams G., Edwards C.J., Moss J., Burger J.A.,
Maini R.N. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals // Arthritis Res. – 2000. –
V. 2. – N 6. – P. 477-488.

ПРИЛОЖЕНИЕ А РИСУНКИ



Рисунок А.1. Морфология кроветворных органов крысы на разных стадиях онтогенеза:

а – зрелый костный мозг. Содержит многочисленные кроветворные клетки различных рядов и стадий дифференцировки. Видны синусоидные капилляры и адипоциты.

б – бедренная кость 20-суточных зародышей. Эпифизы представлены хрящевой тканью, ближе к диафизу гипертрофированной. Явно выраженной костномозговой полости нет, весь объем диафиза занят сетью костных трабекул, между которыми расположены участки разрушающегося хряща, многочисленные мезенхимные клетки и небольшое число кроветворных.

в – печень 14-суточных зародышей. Видны ряды гепатоцитов и просветы синусоидов, но в целом структура органа маскируется обильным кроветворением. Многочисленные бластные и эритроидные клетки, а также мегакариоциты равномерно расположены по всей паренхиме, не образуя обособленных скоплений. Кроветворные клетки часто встречаются в просвете синусоидных капилляров.

г — печень 16-суточных зародышей. Структура сходна с наблюдаемой у 14-суточных зародышей. В паренхиме кроветворных клеток несколько больше, а в синусоидах меньше, чем после 14 суток пренатального развития.

д – печень 20-суточных зародышей. Морфология печени отличается от таковой на предыдущих сроках развития, однако печень еще не имеет структуры зрелого органа. В паренхиме сохраняются очаги эритропоэза и мегакариоцитопоэза, но их величина значительно меньше, чем у 14- и 16-суточных зародышей. В просветах сосудов кроветворные клетки отсутствуют.

е – зрелая печень. Структура печеночных долек полностью сформирована, кроветворение отсутствует.

ж – селезенка 20-суточных зародышей. Белая пульпа отсутствует. По всей паренхиме расположены рыхлые скопления кроветворных клеток, преимущественно эритроидных, но встречаются также гранулоциты и единичные мегакариоциты. Кроветворные клетки отмечаются также в просвете многочисленных синусоидов.

з – зрелая селезенка. Сильно развиты капсула и трабекулы. Белая пульпа представлена многочисленными лимфоидными фолликулами. Признаки активного миелоидного кроветворения в красной пульпе отсутствуют.

Окрашивание гематоксилин-эозином. Увел.: об. x10, ок. x10 (б, ж, з); об. x 20, ок. x10 (а, в, г, д, е).



Рисунок А.2. Данные ПЦР-анализа экспрессии генов основных маркеров МСК – СD73, CD90 и CD105 – в первичных культурах клеток из зрелой селезенки (С), зародышевой селезенки (3C) и зародышевой кости (3K) крысы, а также в культурах клеток 1-го пассажа из зародышевой селезенки (3C 1n) и зародышевой кости (3K 1n) и клеток 2-го пассажа из зрелого костного мозга (KM 2n) крысы. GAPDH использован как внутренний контроль.



Рисунок А.З. Цитокератины в фибробластоподобных и миофибробластоподобных клетках: а – первичная культура печени 16-суточных зародышей, цитокератин-19 в смешанной колонии (фибробласты показаны стрелками); б – первичная культура печени 16суточных зародышей, панцитокератин в колонии фибробластов; в - первичная культура печени 16-суточных зародышей, цитокератин-19 в миофибробластоподобных клетках; г – цитокератин-18 (красное свечение) и десмин (зеленое свечение) в первичной культуре печени 16-суточных зародышей (стрелкой показана клетка, сочетающая оба маркера); д – цитокератин-19 в фибробластах первичной культуры костного мозга; е – цитокератин-19 в 16-суточных культуре клеток печени зародышей на 1-м пассаже. Непрямое иммунофлуоресцентное мечение с применением флуорохрома Alexa 488 (а, в-е) или Alexa 568 (б, г). а', б', в', г', д', е' – совмещение изображения результата иммуномечения и ядер клеток, окрашенных Hoechst 33342.



Рисунок А.4. МуоD на криостатных срезах печени зародышей крысы: *a* – 15 суток развития; *б* – 17 суток развития; *в* – 20 суток развития. Непрямое иммунофлуоресцентное мечение с применением флуорохрома Alexa 488 (a) или Alexa 568 (б, в). a', б', в' – совмещение изображения результата иммуномечения и ядер клеток, окрашенных Hoechst 33342.



Рисунок А.5. Спонтанный миогенез в пассируемых культурах печени 17-суточных (а, в, г) и 16-суточных (б) зародышей: а – миотуба в культуре клеток 1-го пассажа (прижизненная съемка, фазовый контраст); б – десмин в миотубе на 3-м пассаже (непрямое иммунофлуоресцентное мечение с применением флуорохрома Alexa 488); в – отсутствие МуоD на 1-м пассаже (непрямое иммунофлуоресцентное мечение с применение мечение с применением флуорохрома Alexa 568). б', в' – совмещение изображения результата иммуномечения и ядер, окрашенных Hoechst 33342.



Рис А.6. Спонтанная миогенная дифференцировка клеток из селезенки 17-суточных зародышей крысы после 10 суток в первичной культуре: а – скопление миотуб (прижизненная съемка, фазовый контраст); б-г – непрямое иммуноцитохимическое окрашивание на МуоD (б), десмин (в) и тяжелые цепи миозина 2-го типа (г) с применением флуорохрома Alexa 488; б', в', г' - совмещение изображения результата иммуномечения и ядер клеток, окрашенных Hoechst 33342.



Рисунок А.7. Связывание а-бунгаротоксина, меченного тетраметилродамином, с миотубами в первичной культуре печени (а), селезенки (б) и мышечной ткани (в) 17-суточных зародышей крысы. а', б', в' – совмещение изображений миотуб в фазовом контрасте и флуоресценции тетраметилродамина. Участки связывания а-бунгаротоксина показаны стрелками.



Рисунок А.8. Динамика морфологических изменений культуры МСК зрелого костного мозга крысы в ходе остеогенной дифференцировки.

а – 1 сутки индукции. Культура представлена рыхлыми скоплениями типичных фибробластоподобных клеток.

б – 4 суток индукции. Присутствуют участки более плотно расположенных клеток.

в – 6 суток индукции. Очаги дифференцировки более компактны, форма клеток в них близка к кубической.

г – 10 суток индукции. Плотные обособленные скопления остеобластоподобных клеток на начальных стадиях минерализации.

Прижизненная съемка, фазовый контраст.



Рисунок А.9. Остеокальцин в очагах остеогенной дифференцировки МСК костного мозга крысы: а – в стандартной индукционной среде; б – в индукционной среде с bFGF. Непрямое иммунофлуоресцентное мечение с применением флуорохрома Alexa 568). а', б' – совмещение изображения результата иммуномечения и ядер клеток, окрашенных Hoechst 33342.



Рисунок А.10. ALBP в культуре МСК из кости 20-суточных зародышей крысы после 12 суток индукции адипогенеза: а – в цитоплазме зрелых адипоцитов; б – в ядрах клеток. Непрямое иммунофлуоресцентное мечение с применением флуорохрома Alexa 568. a', б' – совмещение изображения результата иммуномечения и ядер клеток, окрашенных Hoechst 33342.



Рисунок А.11. Адипогенная дифференцировка МСК из кроветворных органов крысы в различных условиях: а – МСК кости 20-суточных плодов, 19 суток в стандартной ростовой среде, окрашивание гематоксилином; б – МСК костного мозга, 21 сутки в остеогенной среде, окрашивание гематоксилин-эозином; в – МСК кости 20-суточных плодов, 21 сутки в остеогенной среде, окрашивание жировым красным О и гематоксилином; г - МСК костного мозга, 8 суток в остеогенной среде с 2,5 нг/мл bFGF, прижизненная съемка, фазовый контраст; д - МСК печени 16-суточных зародышей, 14 суток в остеогенной среде с 2,5 нг/мл bFGF, окрашивание жировым красным О и гематоксилином; е – МСК печени 17-суточных зародышей, 14 суток в остеогенной среде с 2,5 нг/мл bFGF, окрашивание жировым красным О и гематоксилином; е – МСК печени 17-суточных зародышей, 14 суток в остеогенной среде с 2,5 нг/мл bFGF, 10 нг/мл bFGF, 1% ITS+1 и 50 мкг/мл 2-фосфо-L-аскорбата натрия, окрашивание жировым красным О. Увел.: об. х10, ок.х10 (а-д); об. х20, ок.х10 (е).



Рисунок А.12. Распределение размеров колоний, образованных КОЕ-Ф с различной чувствительностью к 5-ФУ. * - достоверные отличия от контроля (p<0,05).

313



Рисунок А.13. Адипогенная дифференцировка МСК костного мозга крысы, обработанных 5-ФУ in vitro (a), в сравнении с не обработанными им клетками (б). 13 суток индукции адипогенеза на 1-м пассаже. Окрашивание жировым красным О, ядра докрашены гематоксилином. Увел.: об. x10, ок.x10.



Рисунок А.14. Адипогенная дифференцировка МСК печени 16-суточных зародышей крысы, обработанных 5-ФУ in vitro (a), в сравнении с не обработанными им клетками (б). 14 суток индукции адипогенеза на 1-м пассаже. Окрашивание жировым красным О, ядра докрашены гематоксилином. Увел.: об. x10, ок.x10.



Рисунок А.15. Активность ЩФ в колониях, происходящих из КОЕ-Ф костного мозга крысы: а – прикрепившихся к пластику за первые 7 суток; б – прикрепившихся к пластику за вторые 7 суток; в – прикрепившихся к фибронектину за первые 7 суток; г – прикрепившихся к фибронектину за первые 7 суток; г – прикрепившихся к фибронектину за первые 7 суток; г – прикрепившихся к фибронектину за первые 7 суток; г – прикрепившихся к фибронектину за первые 7 суток; г – прикрепившихся к фибронектину за вторые 7 суток. Ядра докрашены гематоксилином. Увел.: об. х4, ок. х10.



Рисунок А.16. Дифференцировка МСК костного мозга крысы в адипогенной среде на пластике (а), фибронектине (б), коллагене I типа (в) и ламинине (г). 12 суток индукции. Окрашивание жировым красным О и гематоксилином. Увел.: об. x4, ок. x10.



Рисунок А.17. Очаг гемопоэза в эктопическом трансплантате печени 16-суточных зародышей крысы (35 суток после операции). Окрашивание гематоксилин-эозином. Увел.: об. x10, ок. x10 (a); об. x40, ок. x10 (б).



Рисунок А.18. Криогель из агарозы с алкильными группами из 12 атомов углерода с МСК печени 16-суточных зародышей крысы: a – 23 суток in vitro, прижизненная микрофотография (фазовый контраст); б - 28 суток in vitro, срез того же носителя (окрашивание гематоксилин-эозином). Увел.: об. x4, ок. x10 (a); об. x10, ок. x10 (б).



Рисунок А.19. Криогели с МСК через 35 суток после трансплантации крысамреципиентам.

Агарозный криогель с привитой желатиной, 21 сутки инкубации in vitro с МСК из печени 16-суточных зародышей: а –в почке; б – под кожей.

Диметилакриламидный криогель с привитой желатиной, 21 сутки инкубации in vitro с МСК костного мозга: в – в почке; г – под кожей. Гигантские клетки инородных тел показаны стрелками. Окрашивание гематоксилин-эозином. Увел.: об. x20, ок. x10.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б ТАБЛИЦЫ

Таблица Б.1. Клональный рост КОЕ-Ф костного мозга крысы на разных субстратах

Вариант			Инала КОЕ Ф на 1 мли илотои	Доля коле	+ клетки, %	
			число кое-ф на 1 млн клеток	Неокрашенные	≤50% ЩФ+ клеток	>50% ЩФ+ клеток
r .		Пластик	2,42±0,37	Не опр.	Не опр.	Не опр.
LI4	Адгезия в 1-ые / суг. Фн (из плазмы быка)		9,78±0,39 ***	Не опр.	Не опр.	Не опр.
ПО		Пластик	7,42±0,86	Не опр.	Не опр.	Не опр.
•	Адгезия во 2-ые / сут.	Фн (из плазмы быка)	2,05±0,39 ***	Не опр.	Не опр.	Не опр.
2		Пластик	10,13±1,86	36,21±3,90%	34,46±1,18%	29,33±3,88%
IT 2	Адгезия в 1-ые 7 сут.	Фн (из плазмы быка)	11,25±0,46	35,10±9,64%	60,73±6,22%***	4,17±3,42%***
ш		Пластик	4,78±1,12	28,99±15,61%	1,73±1,04%	69,28±16,65%
0	Адгезия во 2-ые / сут.	Фн (из плазмы быка)	6,06±0,81	60,11±8,06%	28,71±8,21%**	11,18±0,77%***
		Пластик	3,83±0,91	15,13±6,48%	53,55±7,99%	31,32±5,93%
ыт 3	Адгезия в 1-ые 7 сут.	Фн (из плазмы человека)	2,25±0,54	49,62±4,62%***	35,00±3,32%*	15,38±5,73%
пС	A 7	Пластик	4,43±1,40	3,27±1,43%	13,43±3,49%	83,30±3,01%
•	Адгезия во 2-ые / сут.	Фн (из плазмы человека)	1,28±0,75*	18,17±18,81%	37,17±17,20%	44,66±21,50%
	Адгезия в 1-ые 7 сут.	Пластик	0,23±0,11	75,00±28,10%	0,00±14,09%	25,00±28,10%
		Ламинин (BioCoat)	$1,04\pm0,88$	24,15±11,24%	57,19±22,48%	18,66±11,24%
4		Коллаген I (BioCoat)	$1,40\pm0,80$	22,24±10,47%	41,13±11,47%	36,63±7,79%
TI		Коллаген I (кислый)	1,33±0,83	54,76±24,09%	26,92±23,57%	18,32±14,05%
HII (Пластик	$0,18\pm0,08$	0,00±16,33%	72,22±42,00%	27,78±21,00%
C	Λ here μ_0 and μ_0 γ_{-1} is γ_{-1}	Ламинин (BioCoat)	0,66±0,67	11,83±14,90%	43,01±42,00%	45,16±42,00%
	Адісзия во 2-віс / сут.	Коллаген I (BioCoat)	4,62±2,84	30,42±11,59%	28,80±6,14%	40,78±15,;0%
		Коллаген I (кислый)	0,60±0,22	6,25±7,03%	51,04±11,71%	42,71±15,22%
		Пластик	1,58±0,56	32,93±11,58%	27,63±12,97%	39,44±6,98%
	A	Ламинин (BioCoat)	$1,98\pm0,41$	61,87±11,34%	20,42±6,38%	17,21±6,03%
S	Адгезия в 1-ые / сут.	Коллаген I (BioCoat)	1,02±0,09	56,73±15,05%	11,48±6,45%	31,79±12,90%
ЫТ		Коллаген I (нейтральный)	0,95±0,22	44,94±15,64%	25,79±8,80%	29,27±11,26%
П		Пластик	4,70±2,12	14,47±5,51%	8,17±1,56%	77,36±7,07%
		Ламинин (BioCoat)	2,44±0,75	24,87±5,77%	12,50±6,14%	62,63±5,38%
	Аді езия во 2-ые / сут.	Коллаген I (BioCoat)	0,96±0,34	30,95±15,36%	5,33±3,58%	63,72±15,36%
		Коллаген I (нейтральный)	$1,80\pm0,67$	53,09±15,36%*	22,17±7,82%	24,74±10,75%***

Примечание. Фн – фибронектин; BioCoat – флаконы BD Biocoat, покрытые коллагеном I типа или ламинином (BD Biosciences, CША). Достоверность различий между контролем (пластик) и опытом (белок матрикса): * - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001.

	D			Доля колоний, содержащих ЩФ+ клетки, %				
	Ва	риант	Число КОЕ-Ф на 1 млн клеток	Неокрашенные	≤50% ЩФ⁺ клеток	>50% ЩФ+ клеток		
	A	Пластик	20,34±1,01	Не опр.	Не опр.	Не опр.		
r 1	Адгезия в 1-ые / сут.	Фн (из плазмы быка)	22,46±0,82	Не опр.	Не опр.	Не опр.		
IPL		Пластик	13,92±2,00	Не опр.	Не опр.	Не опр.		
Ō	сут.	Фн (из плазмы быка)	0,18±0,11	Не опр.	Не опр.	Не опр.		
		Пластик	15,38±1,18	94,42±1,86%	5,58±1,86%	0,00±12,37%		
		Фн (из плазмы быка)	17,48±0,51	91,88±0,76%	7,09±1,04%	1,03±0,64%		
2	Адгезия в 1-ые / суг.	Ламинин (BioCoat)	8,44±2,24**	95,34±1,83%	4,66±1,83%	0,00±12,37%		
L		Коллаген I (BioCoat)	5,70±0,45***	95,52±1,59%	4,48±1,59%	0,00±12,37%		
H	Адгезия во 2-ые 7 сут.	Пластик	1,23±0,57	100,00±12,37%	0,00±12,37%	0,00±12,37%		
0		Фн (из плазмы быка)	0,23±0,19	100%	0%	0%		
		Ламинин (BioCoat)	1,66±0,99	88,99±11,67%	11,01±11,67%	0,00±16,33%		
		Коллаген I (BioCoat)	$0,06{\pm}0,07{*}$	100%	0%	0%		
		Пластик	6,04±1,47	97,56±1,94%	2,44±1,94%	0,00±16,33%		
- 3	Адгезия в 1-ые / сут.	Коллаген I (кислый)	19,70±1,02***	98,94±0,77%	1,06±0,77%	0,00±12,37%		
IPL		Пластик	2,33±2,10	100,00±16,33%	0,00±16,33%	0,00±16,33%		
Ō	Адгезия во 2-ые / сут.	Коллаген I (кислый)	2,85±1,16	100,00±12,37%	0,00±12,37%	0,00±12,37%		
		Пластик	9,20±1,85	92,05±1,11%	4,48±0,66%	3,47±0,96%		
4	Адгезия в 1-ые 7 сут.	Фн (из плазмы человека)	6,28±1,10	95,67±1,41%*	2,51±1,13%	1,82±1,23%		
Ľ		Коллаген I (нейтральный)	8,00±2,39	97,55±1,18%***	$1,98\pm0,68\%^{**}$	0,47±0,51%**		
	A	Пластик	4,40±2,45	100,00±14,09%	0,00±14,09%	0,00±14,09%		
	Адгезия во 2-ые /	Фн (из плазмы человека)	0,15±0,16	100%	0%	0%		
	Cy1.	Коллаген I (нейтральный)	0,63±0,67	100%	0%	0%		

Таблица Б.2. Клональный рост КОЕ-Ф печени 16-суточных зародышей крысы на разных субстратах

Примечание. Фн – фибронектин; BioCoat – флаконы BD Biocoat, покрытые коллагеном I типа или ламинином (BD Biosciences, США). Достоверность различий между контролем (пластик) и опытом (белок матрикса): * - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001.

Транен гантируамі іс је татки			Число	Число Степень развития соединительной ткани:							Кости	Vngu	
Грансилан гирусмыс клетки				камер	-	±	+	++	+++	++++	+++++	Rocib	лрящ
Свежевыделенные (1x10 ⁸ клеток на камеру, 42 суток in vivo)			9		2 (22,22%)		1 (11,11%)	3 (33,33%)	1 (11,11%)	2 (22,22%)	1* (11,11%)	1 (11,11%)	
-		35 cyrok in vivo	3-й пассаж	4				1 (25%)	2 (50%)		1 (25%)	0	0
	0116	42 cyrok in vivo	(1x10 ⁶ клеток на камеру)	5					1 (20%)	1 (20%)	3 (60%)	1 (20%)	0
мые	т 2	9 k in 0)	1-й пассаж (1х10 ⁶ клеток на камеру)	3					1 (33,33%)		2 (66,67%)	2 (66,67%)	2 (66,67%)
сируе	опы	01151 (4 cyroi viv	2-й пассаж (1x10 ⁶ клеток на камеру)	2							2 (100%)	2 (100%)	1 (50%)
Пас		1-й пассаж (1х10 ⁶ клеток на камеру)		5			1 (20%)	1 (20%)	3 (60%)			0	0
		IIBIT 🤅	2-й пассаж (1х10 ⁶ клеток на камеру)	2			1 (50%)		1 (50%)			0	0
		0	3-й пассаж (0,9x10 ⁶ клеток на камеру)	3-й пассаж 10 ⁶ клеток на камеру) 2 1 (50%) 1 (50%)			0	0					
		ır 4	первичная культура (1х10 ⁶ клеток на камеру)	10			2 (20%)	1 (10%)	4 (40%)	3 (30%)		0	0
		0116	1-й пассаж (0,93x10 ⁶ клеток на камеру)	3				1 (33,33%)	1 (33,33%)		1 (33,33%)	0	0

Таблица Б.3. Трансплантация клеток костного мозга крысы в диффузионных камерах

Примечание. Оценка количества соединительной ткани: — - соединительная ткань отсутствует; ± - на внутренней поверхности стенок камеры отдельные фибробласты, не образующие сплошного слоя; + - стенки камеры покрыты изнутри несколькими рядами фибробластов; ++ - от фибробластического слоя, покрывающего стенки, отходят выросты соединительной ткани, не соединяющиеся друг с другом; +++ - соединительнотканные выросты, отходящие от стенок, соединяются, разграничивая внутреннее пространство камеры на отдельные полости, превосходящие ткань по объему; ++++ - приблизительно равное соотношение соединительной ткани и полостей; +++++ - соединительная ткань заполняет большую часть камеры. * - кость содержит кроветворящий костномозговой орган.

Трансплантируемые клетки			типуамі і аматич	Число	Степень развития соединительной ткани:							Кость	Xnguu
				камер	-	±	+	++	+++	++++	+++++	KUCIB	лрящ
Свежевыделенные (1x10 ⁸ клеток на камеру, 42 суток in vivo)			енные (1x10 ⁸ клеток , 42 суток in vivo)	17	5 (29,41%)	3 (17,65%)	6 (35,29%)	3 (17,65%)				2 (11,76%)	0
	rr 1	35 cyr in vivo	1	4			1 (25%)	1 (25%)	1 (25%)	1 (25%)		0	0
іа камеру)	01151	42 cyr. in vivo	1-й пассаж	5			1 (20%)		3 (60%)	1 (20%)		0	0
yembie (1x10 ⁶ klietok i			1-й пассаж	5				1 (20%)	3 (60%)		1 (20%)	0	0
		ıыт 2 т. in vivo)	2-й пассаж	5		2 (40%)		1 (20%)	1 (20%)		1 (20%)	0	0
Пасси		01 (49 cy	4-й пассаж	3		1 (33,33%)		1 (33,33%)	1 (33,33%)			0	0

Таблица Б.4. Трансплантация клеток печени 16-суточных зародышей крысы в диффузионных камерах

Примечание. Обозначения те же, что в таблице Б.З.

Носитель	Источник	Способ загрузки	Число	Среда	Длительность культивирования in vitro перед трансплантацией	Способ	Число репипиентов	Гистологическая картина		
	клеток	клетками	клеток	1		трансплантации	F	Носитель с клетками перед трансплантацией	Трансплантат	
M-	Костный мозг, первичная культура	Нанесение на носитель в малом объеме среды непосредственно перед трансплантацией	Около 7x10 ⁵ кл/носитель	α-MEM	-	В почку на 31 сутки	5	Малочисленные нераспластанные клетки в порах и вблизи поверхности	Частичное рассасывание носителя и очень сильное зарастание соединительной тканью	
Остеопласт	Печень 16- суточных зародышей 1-й пассаж	Культивирование in vitro	1,6х10 ⁵ кл/мл	α- MEM+ 10% FCS	3 - 31 суток	_	-	Круглые или распластанные клетки и их мелкие скопления на поверхности и стенках пор; в первые дни культивирования изредка встречаются слои из 2-3 рядов фибробластов на виещией поверхиости	-	
	Костный мозг, первичная культура	Культивирование in vitro	2,76х10 ⁷ кл/мл	α- MEM+ 15% FCS+ 10 ⁻⁸ M Dex	5 суток	В почку на 35 суток	4	Частичное разрушение носителя, отдельные клетки и небольшие скопления клеток (обычно нераспластанных) в порах и на волокнах	Сильное зарастание носителя	
r-T						В почку на 70 суток	1		соединительной тканью	
Остеоплас	Печень 16- суточных зародышей 1-й пассаж	Культивирование in vitro	1,6х10 ⁵ кл/мл	α- MEM+ 10% FCS	3 - 31 суток	-	-	Единичные клетки, свободно лежащие в порах, реже – прикрепленные, но, как правило, нераспластанные	-	

Таблица Б.5. Культивирование и трансплантация МСК костного мозга и зародышевой печени крысы на пористых носителях

Продолжение таблицы Б.5

								A 11	
Коллаген-хитозановая матрица	Костный мозг, первичная культура	Нанесение на носитель в малом объеме среды непосредственно перед трансплантацией	1,45х10 ⁶ кл/носитель	α-MEM	-	В почку на 56 суток	3	Не опр.	Частичное или полное рассасывание носителя, количество соединительной ткани значительно варьирует между реципиентами
	Костный мозг, первичная культура	Помещение сухих или влажных носителей в суспензию клеток, культивирование in vitro при периодическом покачивании	3х10 ⁵ кл/мл	α- MEM+ 10% FCS	21 сутки	В почку на 35 суток	3	На внешней поверхности носителя и стенках пор (преимущественно в подповерхностном слое) – единичные круглые, реже распластанные клетки и их скопления. Число клеток выше на носителях, помещенных в культуру в сухом состоянии	Носитель сильно деградирован и замещен соединительной тканью, иногда с мононуклеарными клетками и гигантскими клетками инородных тел. В одном из трансплантатов отмечен участок костной ткани
	Костный мозг, первичная культура	Культивирование in vitro	3х10 ⁴ кл/мл	α- MEM+ 15% FCS+ 10 ⁻⁸ M Dex +50 мкг/мл Asc-2-P	12 суток	В почку на 35 суток	4	Крайне малочисленные клетки, прикрепленные к волокнам	Частичное или полное рассасывание носителя, большое количество соединительной ткани с адипоцитами и гигантскими клетками инородных тел
	Печень 16- суточных зародышей свежевы- деленные клетки	Нанесение на носитель в малом объеме среды непосредственно перед трансплантацией	200х10 ⁶ кл/носитель	α-MEM	-	Под кожу на 42 суток	2	Не опр.	Почти полное рассасывание носителя, много соединительной ткани с адипоцитами и гигантскими клетками инородных тел
	Печень 16- суточных зародышей 1-й пассаж	Культивирование in vitro	1,6х10 ⁵ кл/мл	α- MEM+ 10% FCS	13 суток	В почку на 35 суток	1	Малочисленные круглые клетки в порах и на поверхности	На месте трансплантации - обширный рубец, материал носителя не выявляется
Продолжение таблицы .Б.5

Губка гемостатическая коллагеновая	Костный мозг, свежевы- деленные клетки, в том числе после обработки 5-ФУ in vivo	Нанесение на носитель в малом объеме среды непосредственно перед трансплантацией	4х10 ⁶ кл/носитель	α-MEM	-	В почку на 42 суток	3	В месте нанесения суспензии - крупное рыхлое скопление круглых клеток на волокнах носителя	На месте трансплантации – рубцовая ткань, материал носителя не выявляется
Коллагеновый криогель	Костный мозг, первичная культура	Культивирование in vitro; часть носителей предварительно выдерживали в растворе Фн (100 мкг/мл) в течение 1 ч	7,3х10 ⁵ кл/мл	α-MEM+ 15% FCS, или α-MEM+ 15% FCS+ 12,5 мкг/мл Фн	4, 11, 21 суток	-	-	Сравнительно малочисленные клетки в порах и на волокнах, на ранних сроках преимущественно круглые, на поздних – распластанные. Присутствие Фн в среде или на поверхности носителя приводит к увеличению числа клеток в носителе, но лишь на ранних сроках культивирования	-
	Костный мозг, первичная культура	Нанесение на носитель в малом объеме среды с последующим добавлением остальной среды и культивировани- ем in vitro; носитель предварительно выдерживали в растворе Фн (100 мкг/мл) в течение 1 ч	6х10 ⁶ кл/носитель	α- MEM+ 15% FCS	14 суток	-	-	Множество погибших клеток в порах и на волокнах; живые клетки сравнительно малочисленны, часто имеют морфологию фибробластов, прикреплены к волокнам небольшими группами	-

Продолжение таблицы Б.5

Агарозный криогель	Печень 16- суточных зародышей первичная культура	Культивирование in vitro, в первые 30 мин – покачивание на шейкере при комнатной температуре	5,33x10 ⁵ кл/мл	α- MEM+ 10% FCS	3 - 28 суток	-	-	Немногочисленные, как правило, не распластанные клетки, преимущественно вблизи поверхности и в местах разрушения носителя. Число клеток убывает в ходе культивирования	-
Агарозный криогель с привитыми алкильными группами	Печень 16- суточных зародышей первичная культура	Культивирование in vitro, в первые 30 мин – покачивание на шейкере при комнатной температуре	5,33x10 ⁵ кл/мл	α- MEM+ 10% FCS	3 - 28 суток	-	-	Малочисленные клетки в порах и на их стенках, не образующие крупных скоплений и, как правило, сохраняющие круглую форму. В ходе культивирования число клеток убывает	-
Агарозный криогель с привитой желатиной	Костный мозг, первичная культура	Инкубация носителя в суспензии клеток при +37°С при периодическом покачивании	4,67х10 ⁶ кл/мл	α- MEM+ 15% FCS	1 сутки	В почку на 35 суток	8	Не опр.	Сильное зарастание носителя соединительной тканью; множество гигантских клеток инородных тел
	Костный мозг, первичная культура	Культивирование in vitro	1,2x10 ⁵ кл/мл	α- MEM+ 15% FCS	16 суток	В почку на 32 суток	5	Не опр.	Сильное зарастание носителя соединительной тканью; множество гигантских клеток инородных тел
	Костный мозг, первичная культура	Культивирование in vitro	5х10 ⁵ кл/мл	α- MEM+ 10% FCS	21 сутки	-	-	Крайне малочисленные округлые клетки в порах и на их стенках	-
	Печень 16- суточных зародышей 1-й пассаж	Инкубация носителя в суспензии клеток при +37°С при периодическом покачивании	1,6х10 ⁶ кл/мл	α- MEM+ 10% FCS	2 ч	В почку на 21 сутки	7	К стенкам пор прикреплены отдельные клетки, округлые или распластанные, и их небольшие группы	Сильное зарастание носителя соединительной тканью; множество гигантских клеток инородных тел

Продолжение таблицы Б.5

Агарозный криогель с привитой желатиной	Печень 16- суточных зародышей первичная культура	Культивирование in vitro	6х10 ⁵ кл/мл	α- MEM+ 10% FCS	21 сутки	В почку на 35 суток Под кожу на 35 суток	1	Малочисленные клетки (изредка группы из нескольких клеток) в порах и на поверхности, как правило, нераспластанные	Сильное зарастание носителя соединительной тканью; множество гигантских клеток инородных тел Умеренное зарастание носителя рыхлой соединительной тканью с гигантскими клетками инородных тел
	Печень 16- суточных зародышей первичная культура	Культивирование in vitro, в первые 30 мин – покачивание на шейкере при комнатной температуре	5,33х10 ⁵ кл/мл	α- MEM+ 10% FCS	3 - 28 суток	-	-	На первой неделе культивирования – отдельные, преимущественно округлые клетки и их скопления в порах и на их стенках; при повышенном содержании желатины в составе носителя – значительное число распластанных клеток; на поздних сроках культивирования – снижение числа клеток	-
Криогели из смеси агарозы и желатины	Костный мозг, первичная культура	Культивирование in vitro	6,2х10 ⁵ кл/мл	α- MEM+ 10% FCS	3 – 7 суток	-	-	Немногочисленные, преимущественно округлые клетки, число которых возрастает с увеличением содержания желатины в носителе. На криогеле с преобладанием желатины встречаются распластанные фибробласты	-

								Ок	ончание таблицы Б.5
Диметилакриламидный криогель с привитой желатиной	Костный мозг, первичная культура	Культивирование in vitro	5х10 ⁵ кл/мл	α- MEM+ 10% FCS	21 сутки	В почку на 35 суток	1	Клетки отсутствуют или крайне малочисленны	Умеренное зарастание носителя рыхлой соединительной тканью; множество гигантских клеток инородных тел и мононуклеарных клеток
						Под кожу на 35 суток	1		Умеренно или слабо выраженная рыхлая соединительная ткань с гигантскими клетками инородных тел и множеством мононуклеарных клеток
	Печень 16- суточных зародышей крысы, первичная культура	Культивирование in vitro	6х10 ⁵ кл/мл	α- MEM+ 10% FCS	21 сутки	-	-	Малочисленные клетки на поверхности и стенках пор, расположенные поодиночке или небольшими группами, округлые или распластанные	-

Примечание: FCS – сыворотка плодов коровы; Dex – дексаметазон; β-GP - β-глицерофосфат; Asc-2-P - 2-фосфо-L-аскорбат натрия; Φн – фибронектин плазмы человека.