

МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

А.Ю. Устюгов^{1,2}, С.А. Румянцев^{1,2,3}

¹ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева МЗ России, Москва, Россия

² Российский национальный исследовательский университет им. Н.И. Пирогова МЗ России, Москва, Россия

³ Московский физико-технический институт (государственный университет), Москва, Россия

The models for the study of biological properties of human hematopoietic stem cells

A.Yu. Ustyugov^{1,2}, S.A. Rumyantsev^{1,2,3}

¹ D. Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, MH of Russia, Moscow, Russia

² N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, MH of Russia, Moscow, Russia

³ Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Moscow, Russia

В статье рассматриваются различные экспериментальные модели *in vivo*, внесшие вклад в понимание гемопоэза и приживления гемопоэтических стволовых клеток в зависимости от источника их получения. Описаны относительные достоинства и недостатки каждой из приведенных моделей, общей особенностью которых является то, что наивысший уровень приживления отмечается при использовании клеток пуповинной крови, несколько меньший — в случае костномозговых клеток и, наконец, самый низкий — при использовании мобилизованных клеток периферической крови. Однако, несмотря на прогресс, достигнутый за годы исследований, причина относительно низкого уровня человеческих клеток, генерируемых в этих моделях, до сих пор не ясна. Но, возможно, эта проблема будет решена с использованием достижений генной инженерии.

Ключевые слова: клеточные препараты, гемопоэтические стволовые клетки, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, *ex vivo* экспансия.

В последние 20 лет важную роль в понимании гемопоэза человека внесли доклинические исследования с использованием различных моделей *in vivo* [1–6]. Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) являются ключевыми участниками гемопоэза. Небольшая популяция ГСК способна дать начало потомству клеток с высокой пролиферативной активностью, которые в свою очередь могут дифференцироваться в миллионы зрелых лимфогемопоэтических клеток, что было доказано в экспериментальных и клинических исследованиях по трансплантации костного мозга [7–11].

Первоначально эти свойства ГСК были показаны в экспериментах по трансплантации на мышах, где с целью демонстрации восстановления популяций лимфоидной и миелоидной линий у реципиента использовали генетические маркеры, которые отсутствовали у животного-донора [12–17]. Возможность применения меченных ретровирусом ГСК позволила провести более детальный анализ их приживления и пролиферации после трансплантации. В результате этих исследований появилось представление о возможном поведении донорских ГСК у реципиента [18, 19].

По аналогии с мышинными проводилось изучение ГСК человека, где для селективного выявления использовали костный мозг с различными генетическими метками [20] или аутогенные клетки, трансдуцированные ретровирусными векторами. Однако данные исследования были ретроспективными из-за

The article describes different experimental *in vivo* models applied to achieve knowledge of hemopoiesis and stem cell source-dependent mechanisms of engraftment. Although all the models have relative advantages and drawbacks, they all have one common feature — the cord blood engraftment kinetics are better, than those of bone marrow stem cells, while those are superior to peripheral blood mobilized stem cells. In spite of all the progress achieved by prolonged research, the cause of relatively low level of the human cells generated in these models is still unclear. The solution to this problem may be found with the aid of gene engineering achievements.

Key words: cell preparations, hematopoietic stem cells, multipotent mesenchymal stromal cells, *ex vivo* expansion.

ограниченного числа информативных клинических данных и низкого уровня ретровирусной трансдукции [21–23]. Помимо *in vivo* моделей, развитие исследований *in vitro* с использованием примитивных ГСК человека облегчило изучение гемопоэза. Модели, в которых применялось длительное культивирование костномозговых культур, продемонстрировали способность примитивных ГСК дифференцироваться в клетки различных миелоидных и лимфоидных линий [24–26]. В одной из работ была описана способность LT-CIC клеток (LT-CIC — стволовые клетки, обеспечивающие кроветворение в длительной культуре костного мозга) поддерживать популяцию гемопоэтических клеток-предшественниц в культуре до 100 сут. [26]. В экспериментах S.J. Szilvassy et al. (1990) продемонстрирована прямо пропорциональная зависимость между количеством LT-CIC и способностью ГСК к самообновлению в ходе серийных трансплантаций [27, 28]. Корреляция между клинической трансплантацией и *in vitro* моделями исследований ГСК человека значительно расширила возможности изучения гемопоэза.

Также известно, что трансплантированные клетки или органы от одного вида другому (ксенотрансплантаты) могут поддерживаться в макроорганизме, если они вводятся до того, как у животного появляется компетентная иммунная система [29–31]. Трансплантированный орган или клетки служат для «обучения» развивающейся иммунной системы, создавая толерантность к гетерологичным клеткам.

e-mail: s_rumyantsev@mail.ru

Имеется ряд методов индукции толерантности в развивающейся мышце, овце и свинье, которые эффективны в области изучения органной трансплантации [1–3].

Линии человеческих клеток, опухоли и органы, трансплантированные иммунодефицитным мышам, функционируют долгое время благодаря обеспечению соответствующего микроокружения, в котором трансплантированные клетки или ткани могут приживаться или претерпевать экспансию долгое время без отторжения организмом животного-хозяина. Описано множество линий мышей с естественно развивающимися мутациями или с направленными повреждениями генов, которые важны для нормальной иммунной функции [32, 33]. Для трансплантируемых ГСК человека в ходе доклинических исследований наиболее часто используются модели, представляющие собой естественно развивающиеся рецессивные мутации тяжелого комбинированного иммунодефицита (*scid*), *beige* (*bg*), *nude* (*nu*) и X-сцепленного иммунодефицита (*xid*), которые оказались наиболее полезными в исследованиях.

Таким образом, мы видим, как разнообразные экспериментальные модели по изучению биологических свойств клеток и их взаимодействию друг с другом способны дополнять друг друга и служить развитию науки в целом. В данной статье мы стараемся кратко описать различные экспериментальные модели, внесшие вклад в понимание гемопозза.

Модель ксенотрансплантации плодам овцы

Гестационный период у овцы составляет приблизительно 160 сут. В интервале между 50 и 60 днями гестации система кроветворения плода овцы быстро развивается. Это развитие предшествует началу функционирования иммунной системы между 67 и 77 днями гестации. Группа E.D. Zanjani (1996, 1997) показала, что трансплантация ГСК человека в период между 50 и 60 днями гестации может облегчить приживание и существование человеческих клеток в плоде овцы до того, как иммунная система станет активной и не сможет индуцировать толерантность к человеческим антигенам [1–3]. Таким образом, понимание комбинации увеличения приживания и толерантности позволило бы обеспечить пролонгированную выживаемость трансплантата.

Первое описание длительного приживания ГСК человека у плода овцы было опубликовано A.W. Flake et al. в 1986 г. [34]. Фетальные клетки печени человека были выбраны для первых экспериментов, так как печень плода не содержит никаких Т-лимфоцитов, которые могут приводить к развитию реакции трансплантат против хозяина (РТПХ). Клетки трансплантировали 65-дневным плодам овцы. В большой серии рожденных животных, изученной за 10 лет, приблизительно у 70% обнаруживались ГСК человека в периферической крови и костном мозге [35–38]. Количество человеческих клеток в среднем составляло около 5% и было представлено всеми линиями гемопозза, включая Т-клетки. Человеческие клетки идентифицировались до 4-летнего возраста животного [35–38]. Для оценки самообновления костномозговых клеток от первичных животных ГСК трансплантировали вторичным доиммунным плодам. Приблизительно у одной трети реципиентов были обнаружены человеческие клетки,

что демонстрирует самообновление исходных прижившихся клеток [37, 38]. Более того, доля человеческих клеток в химерных овцах могла быть увеличена путем инъекции рекомбинантных человеческих цитокинов. Так, инъекция комбинации интерлейкина-3 (IL-3) и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) человека или человеческого фактора стволовых клеток (SCF) увеличивала количество выявленных человеческих клеток в периферической крови или костном мозге овцы в пять и в два раза, соответственно [39, 40].

Фетальные клетки печени человека не используются как источник ГСК для клинической трансплантации. По этой причине E.D. Zanjani et al. (1990, 1993, 1995) определяли, могут ли клетки костного мозга взрослого человека или пуповинной крови, которые широко применяются в качестве источника ГСК в клинике, приживляться у плода овцы [41–43]. Приблизительно у 50% овец, которым трансплантировали человеческий костный мозг или клетки пуповинной крови, трансплантат прижился, обеспечив долю человеческих клеток такую же (костный мозг) или большую (пуповинная кровь), как и у реципиентов клеток фетальной печени человека [41–43]. К сожалению, у более 80% этих реципиентов развились признаки РТПХ, которые осложняли проследивание долгосрочных результатов [41–44]. Трансплантация костного мозга или пуповинной крови с деплецией Т-клеток предотвращала РТПХ, но была ассоциирована с более низким уровнем приживания и долей выживших животных [43, 44]. Также было показано, что совместная инъекция человеческих стромальных клеток костномозгового происхождения с человеческими CD34⁺-клетками костного мозга человека после деплеции Т-клеток улучшает долговременное приживание [45]. Эти результаты почти идентичны тем, которые наблюдаются при трансплантациях костномозговых клеток в клинике, и подтверждают адекватность модели плодов овцы для анализа ГСК человека.

Исследовательская группа во главе с E.D. Zanjani в 1993 г., изучая ГСК человека, подняла фундаментальный вопрос относительно их фенотипа [36]. Большинство протоколов обогащения ГСК человека основаны на данных о том, что они экспрессируют CD34 антиген и характеризуются отсутствием маркеров зрелых миелоидных или лимфоидных клеток, таких, как Lin. Lin⁻/CD34⁺/HLA-DR⁻-клетки костного мозга человека способны к долговременному приживлению в плодах овцы и продукции зрелого потомства всех линий в отличие от Lin⁻/CD34⁺/HLA-DR⁺-клеток, которые не приживаются [44]. CD38 экспрессируется колоние-формирующими клетками, но, вероятно, не характерен для ГСК. Для подтверждения этой гипотезы Lin⁻/CD34⁺/CD38⁻ и Lin⁻/CD34⁺/CD38⁺-костномозговые клетки трансплантировали плодам овцы. Длительное приживание наблюдалось у животных, получивших клетки первой популяции, в то время как после внутритрубногo введения Lin⁻/CD34⁺/CD38⁺-клеток наблюдалось транзитное, кратковременное приживание [44]. В аналогичной работе было показано, что CD133 совместно с CD34 может быть использован как маркер ГСК [46]. Исследования на иммунодефицитных мышах, которым инъецировали ГСК человека, свидетельствовал, что CD34⁻-клетки также могут приживляться и генерировать зрелые человеческие ГСК [47]. Когда CD34⁺- и CD34⁻-клетки

костного мозга или периферической крови человека после обработки цитокинами вводили плодам овцы, обе популяции приживлялись и давали начало человеческим ГСК, подтверждая первоначальные наблюдения [48, 49].

Самообновление ГСК и поддержание примитивных клеток-предшественниц в овечьих химерах исследовались в других сериях экспериментов. В частности, плодам овцы трансплантировали $\text{Lin}^-/\text{CD34}^+$ -клетки костного мозга человека, различающиеся по экспрессии Thy-1 [50, 51]. Интересно, что приживление наблюдалось только у животных, которые получили $\text{CD34}^+/\text{Lin}^-/\text{Thy-1}^+$ -клетки, тогда как в случае Thy-1^- -клеток приживления не было показано. После 3 мес. у овец, которые получили $\text{CD34}^+/\text{Lin}^-/\text{Thy-1}^+$ -клетки, определялось количество примитивных CD34^+ -клеток, которые могли экспортировать краситель Родамин 123 (Rho^{10}), а также численность CAFC (cobblestone area-forming cells). По количеству CAFC можно спрогнозировать число примитивных гемопоэтических клеток-предшественниц со свойствами, соответствующими ГСК. Частота CAFC среди $\text{CD34}^+\text{Rho}^{10}$ -клеток и в химерных овцах была сходна с частотой CAFC среди $\text{CD34}^+\text{Rho}^{10}$ -клеток в оригинальном трансплантате [51]. Эти исследования продемонстрировали, что исходная популяция $\text{CD34}^+/\text{Lin}^-/\text{Thy-1}^+$ -клеток содержит примитивные ГСК, способные к приживлению и экспансии в организме овцы [50, 51].

В исследованиях на мышах высокий уровень экспрессии $c\text{-kit}$ рецептора был характерен для ГСК [17, 18]. Человеческие CD34^+ -костномозговые клетки, которые экспрессировали $c\text{-kit}$ на высоком ($c\text{-kit}^{\text{high}}$) и низком ($c\text{-kit}^{\text{low}}$) уровнях или не экспрессировали вовсе ($c\text{-kit}^-$), инъецировали плодам овцы. Незначительный уровень приживления определялся у животных, которые получили $\text{CD34}^+/\text{c-kit}^-$ -клетки [52]. Первоначально приживление наблюдалось на сходном уровне у животных, которым трансплантировали человеческие $\text{CD34}^+/\text{c-kit}^{\text{high}}$ - и $\text{CD34}^+/\text{c-kit}^{\text{low}}$ -клетки. Однако после 3 мес. только в случае введения клеток с низким уровнем экспрессии $c\text{-kit}$ в организме животных-реципиентов определялись клетки человека [42]. Эти данные позволяют утверждать, что примитивными человеческими клетками, ответственными за приживление и экспансию в организме плода овцы, были $\text{CD34}^+/\text{c-kit}^{\text{low}}$ -клетки [52].

Плод овцы также использовался в качестве модели для исследования генетических заболеваний человека, таких как X-сцепленный тяжелый комбинированный иммунодефицит (X-SCID), который характеризуется дефицитом T-лимфоцитов и нефункциональными B-лимфоцитами, что в свою очередь приводит к отсутствию гуморального и цитотоксического иммунного ответа. X-SCID вызывается мутацией гена γ -рецептора IL-2, который кодирует общую γ -цепь (γ c) рецепторов IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 и IL-15 [53]. Чтобы определить, может ли плод овцы служить удобоваримой моделью для исследования терапии X-SCID, цитокин-мобилизованные CD34^+ -клетки периферической крови от пациентов с X-SCID трансплантировались плодам овцы. Так же, как у X-SCID пациентов, человеческие γ c-миелоидные клетки и B-клетки были найдены в овечьих химерах, но T-лимфоциты отсутствовали. Трансдукция клеткам X-SCID пациентов ретровируса, содержащего ген γ -рецептора IL-2, до трансплантации приводила к об-

разованию овец-химер с большим количеством γ c⁺-T-лимфоцитов [54], что совпадало с результатами клинического исследования генной терапии X-SCID [55, 56]. Однако у 2 из 11 пациентов в клиническом исследовании впоследствии развилась T-клеточная лейкемия [57], тогда как в эксперименте — у шести овечьих химер — не отмечалось побочных эффектов в течение 10 мес. наблюдения [54].

Мышиные модели

Несмотря на то, что плод овцы удовлетворяет всем критериям, необходимым для использования в качестве модели человеческого гемопоэза, она неприемлема для большинства исследовательских лабораторий. Расходы на содержание больших животных в комбинации с 100-кратным увеличением количества цитокинов, необходимых для выработки наибольшего количества человеческих клеток, определяют значительные экономические ограничения для использования этой модели. Кроме того, трансплантация человеческих клеток в плод овцы требует тонких и сложных хирургических навыков, которыми мало кто обладает. Многие научные группы работали над созданием животной модели человеческого гемопоэза, которая суммировала бы преимущества, демонстрируемые плодом овцы с экономической эффективностью небольшой животной модели. Эти усилия сфокусировались на мышах с генетически обусловленными иммунодефицитами [32, 33].

BNX мыши

BNX мыши являются гомозиготными по трем мутациям, вызывающим иммунодефицит: мутация аллеля *beige* (*bg*, бежевый), мутация аллеля *nude* (*nu*, лысый) и X-сцепленный иммунодефицит (*xid*).

Мыши, гомозиготные по *bg*-мутации, имеют гипопигментацию кожи, и у них формируются гигантские внутриклеточные гранулы, приводящие к неправильной сортировке лизосомальных белков. Иммунная функция у этих мышей нарушена прежде всего из-за дефекта активности натуральных киллеров (NK-клетки). Эффекты *bg*-мутации сходны с таковыми при человеческом синдроме Чедиака-Хигаши (CHS). Были выделены гены, содержащие *bg* и CHS-мутации [58, 59]. Мышиные и человеческие гены высоко гомологичны, экспрессируются повсеместно и кодируют белок, который напоминает статин — протеин, вовлеченный в полимеризацию микротрубочек [58, 59].

Мыши, гомозиготные по *nu*-мутации, являются лысыми и не имеют тимуса; последнее приводит к тяжелой супрессии иммунной системы [60]. Ген, который мутирован у *nu*-мышей и крыс, является членом *winged helix* или *fork head* семейств транскрипционных факторов [61, 62]. Мутация *xid* вызывает легкий иммунный дефект, ассоциированный с потерей некоторых функций B-клеток у гомозиготных самок или гемизиготных самцов мышей [63]. Мутация *xid* является точечной мутацией в гене тирозинкиназы Брутона или *Btk* гене [64, 65].

Комбинация *xid* и *nu* мутаций вызывает иммунодефицит, который тяжелее, чем при каждой мутации в отдельности. Недостаточность NK-клеток, вызванная *bg*-мутацией, делает *bg/bg*, *nu/nu*, *xid/-* (известных как BNX) мышей почти полностью иммунодефицитными.

Оригинальное описание успешной трансплантации и поддержания примитивных человеческих гемопоэтических клеток в мышинной модели было сделано S. Kamel-Reid и J.E. Dick (1988), которые вводили человеческие костномозговые клетки сублетально облученным BNX мышам [66]. Мыши-реципиенты содержали низкие концентрации (<1%) человеческих клеток в костном мозге и селезенке, которые можно было определить за счет выявления человеческой повторяющейся ДНК в этих органах. Вдобавок, человеческие колоние-формирующие клетки из тех же тканей могли быть идентифицированы путем их избирательного роста в питательной среде с добавлением человеческих цитокинов IL-3 и GM-CSF. Так как эти цитокины не поддерживают рост мышинных колоние-формирующих клеток, была возможность простимулировать небольшое количество человеческих клеток-предшественниц в течение 8 нед. после трансплантации [66].

Основываясь на этом первоначальном успехе, другие исследовательские группы сфокусировались на проблеме увеличения низкого уровня человеческих клеток, приживающихся у BNX мышей. Так, J.A. Nolta et al. (1994) предположили, что мышинное микроокружение может быть «негостеприимным» для ГСК человека и выдвинули гипотезу, согласно которой одновременное введение с ГСК стромальных клеток человека, обеспечивающих продукцию ИЛ-3 (видоспецифический цитокин, который важен для поддержания и дифференцировки ГСК человека), может привести к формированию оптимальных ниш для ГСК [67]. Ко-трансплантация ГСК и процессированной стромы костного мозга улучшила степень приживления человеческих клеток на 6% [67]. Человеческие гемопоэтические клетки-предшественницы выделялись из селезенки и костного мозга мыши-реципиента до 9 мес. после трансплантации. Так как процессированные стромальные клетки не персистируют так долго, как гемопоэтические клетки-предшественницы, авторы заключили, что введение стромальных клеток облегчает приживление и пролиферацию ГСК человека [67]. В этом же исследовании авторы показали, что клетки, ответственные за долговременное приживление, экспрессировали CD34 [67].

У BNX мышей, перенесших трансплантацию костномозговых CD34⁺-клеток, отмечалась продукция человеческих Т-лимфоцитов, клеток-предшественниц и зрелых клеток большинства миелоидных типов, однако отсутствовала продукция В-лимфоцитов [68].

Поскольку полный набор типов ГСК человека не может быть полностью выявлен у большинства BNX мышей, подвергшихся трансплантации, окончательный анализ ГСК человека провести невозможно. Однако потенциал дифференцировки в лимфоидные и миелоидные клетки — это свойство, ассоциированное с большинством примитивных гемопоэтических клеток-предшественниц. Для выяснения вопроса, способны ли любые клетки, которые приживались в организме BNX мыши, давать начало и лимфоидным, и миелоидным клеткам, человеческие CD34⁺-клетки пуповинной крови, трансфицированные ретровирусами с геном резистентности к неомичину (*neo*), трансплантировали облученным BNX мышам наряду с процессированными стромальными клетками. После трансплантации человеческие гемопоэтические колонии, содержащие *neo*-провирус,

выделяли из животных-реципиентов. Авторы также отделяли человеческие CD33⁺-миелоидные и CD3⁺-лимфоидные клетки от мышинных клеток путем FACS-сортировки и отдельно культивировали миелоидные и Т-лимфоцитарные колонии. ДНК выделяли из колоний, и наличие провируса подтверждали путем полимеразной цепной реакции (ПЦР) [69]. Если миелоидные клетки-предшественницы и Т-лимфоциты, содержащие *neo*-провирус, происходили из одних клеток-предшественниц, то ген ретровируса должен был быть встроен в одно и то же место генома в каждом типе клеток. Место встраивания провируса устанавливали с помощью ПЦР, где длинная концевая последовательность провируса встраивалась в клеточную ДНК [70]. В ходе анализа полученных результатов было выявлено, что во всех клетках-предшественницах провирус имел одинаковую локализацию. Эти исследования представили первые и наиболее существенные доказательства наличия среди человеческих клеток, которые приживляются в BNX мышам, клеток, которые имеют свойства, ассоциированные с ГСК [69].

SCID мыши

Несмотря на изначальный успех с BNX мышами, низкий уровень приживления человеческих клеток привел к тому, что многие группы исследовали перешли к использованию SCID мышей в качестве реципиентов человеческих клеток. Мутация *scid* — это делеция гена ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПК) [71]. Мыши, гомозиготные по мутации *scid*, не имеют функциональных В- и Т-лимфоцитов из-за дефектов V(D)J рекомбинации и восстановления двуспиральных разрывов, делающих SCID мышей дефицитными и в клеточных, и в гуморальных иммунных функциях. T. Lapidot et al. (1992) продемонстрировали, что приживление человеческих клеток, введенных CB.17 SCID мыши, было выше по сравнению с приживлением, наблюдаемым у BNX реципиентов. Также улучшение приживления и пролиферации человеческих клеток может быть получено у SCID мышей, которым вводили человеческие SCF и PIXY 321 — молекулы слияния (*fusion molecule*). Человеческие клетки персистировали в костном мозге мыши 8–10 нед., т.е. время, в течение которого животные обычно выводились из эксперимента [72].

Несмотря на то, что гомозиготные *scid/scid* мыши имеют дефицит гуморальных и клеточных иммунных функций, NK-клетки у них функционируют нормально. Благодаря тщательной работе L. Shultz et al. (1995) было выяснено, что линия мышей с диабетом без ожирения (*nonobese diabetes*, NOD) является NK-дефицитной [73]. Мутация *scid* была перенесена на NOD основу путем повторного обратного скрещивания. Получившаяся в результате линия, обозначенная как NOD-SCID, является «более иммунодефицитной», чем любые другие линии, несущие *scid* мутацию, из-за дефицита NK-клеточной активности [73]. Показано, что мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) мышей NOD-SCID в лучшей степени поддерживают приживление ГСК человека, нежели ММСК мышей других иммунодефицитных линий [74]. По сравнению с CB.17 SCID или другими SCID линиями, уровень приживления ГСК человека у NOD-SCID мышей составлял в среднем 10–30% в зависимо-

сти от количества и источника введенных клеток [75–77]. Приблизительно 30% гомозиготных NOD-SCID мышей склонны к развитию тимом, которые, как было показано, являются результатом эндогенного внедрения ретровируса Emv-30 [78]. Осторожное обратное скрещивание привело к развитию дополнительной линии NOD-SCID мышей, у которых частота тимом была значительно снижена [79]. Остаточная иммунная функция у NOD-SCID мышей далее компрометирована путем обратного скрещивания аллеля с выпадением β_2 -микроглобулина и NOD-SCID фона. NOD-SCID β_2 -0 мыши поддерживают наибольший уровень трансплантированных человеческих клеток [79].

Человеческие клетки, выявляющиеся у NOD-SCID мышей после трансплантации, относились, прежде всего, к В-клеточной линии (CD19⁺) с небольшим количеством миелоидных клеток (CD14⁺ и CD11b⁺). Иногда небольшое количество человеческих Т-лимфоцитов может быть идентифицировано в рудиментарном тимусе NOD-SCID мышей. Однако зрелые эритроидные клетки и эритроидные клетки-предшественницы не могут быть достоверно определены у NOD-SCID мышей, подвергнутых трансплантации нормальных костномозговых CD34⁺-клеток [80].

Как и с BNX мышами, неспособность поддерживать все гемопоэтические линии осложняет анализ активности человеческих ГСК у NOD-SCID мышей. В этой связи, клетки, которые восстанавливают лимфоцитарную популяцию у SCID мышей, обычно описываются как SCID-репопулирующие клетки (SRC) [5, 80]. Аналогично человеческим ГСК, SRC входят в состав Lin⁻/CD34⁺-популяции клеток пуповинной крови человека, костного мозга и мобилизованной периферической крови. Также многие авторы обнаружили, что Lin⁻/CD34⁺/CD38⁻-субпопуляция клеток содержит большое количество SRC [81–83]. Недавно было показано, что ГСК человека у NOD-SCID мышей происходят из двух популяций CD34⁺-клеток. «Первая волна» клеток происходит из коротко живущих предшественников; «вторая волна», которая перекрывает первую, происходит из долго живущих клеток-предшественниц [84]. Эти данные позволили авторам предположить, что первая и вторая волны человеческих ГСК могут отражать потомство CD34⁺/CD38⁻ и CD34⁺/CD38⁻-клеток, соответственно.

Также у NOD-SCID мышей были обнаружены признаки наличия человеческих примитивных гемопоэтических клеток-предшественниц, которые не экспрессировали CD34. Данный феномен был описан, когда NOD-SCID мышам вводились CD34⁻-клетки. Человеческие гемопоэтические клетки-предшественницы и зрелые клетки образовывались в количествах, которые могли конкурировать с таковыми, образующимися при трансплантации CD34⁺-клеток [47]. Многие из клеток у NOD-SCID реципиентов, перенесших трансплантацию CD34⁻-клетками, экспрессировали CD34, тем самым указывая на то, что CD34⁻-клетки могут давать начало CD34⁺-клеткам у NOD-SCID и BNX мышей [47, 85].

Аналогично BNX мышам, клональный человеческий гемопоэз показан у NOD-SCID реципиентов человеческих клеток с вирусной трансфекцией. N.C. Josephson et al. (2002) исследовали множественные клоны CD19⁺-В-лимфоцитов и экспонированные популяции отдельных миелоидных клеток, полученных у NOD-SCID мышей, которым транс-

плантировали клетки, трансфицированные foamy-вирусом [86]. В отличие от BNX мышей, где все включения в лимфоидные клеточные линии имели партнеров среди миелоидных клеток, у NOD-SCID мышей менее 20% провирусных включений имели партнеров в В-лимфоцитарных клонах и миелоидных клетках [87]. Таким образом, эти данные подтвердили, что человеческие клетки, присутствующие у NOD-SCID мышей через 6–10 нед. после трансплантации, происходят из различных популяций коротко живущих и долго живущих SRC.

NOD-SCID мыши используются как модели для изучения человеческих гемопоэтических заболеваний. Серии исследований показали, что костномозговые клетки пациентов с лимфоидными и миелоидными лейкозами, трансплантированные SCID мышам, участвуют в развитии лейкозий [86–91]. Также имеется несколько примеров использования NOD-SCID мышей как модели для изучения наследственных человеческих гемопоэтических заболеваний. Так, костный мозг пациентов с β -талассемией имеет явную эритроидную гиперплазию, вызванную неэффективной продукцией красных клеток. Когда NOD-SCID мышам трансплантировались костномозговые CD34⁺-клетки, полученные от пациентов с β -талассемией, эритроидная гиперплазия являлась достаточной для преодоления обычно неэффективной продукции эритроидных клеток у животного-реципиента [75]. NOD-SCID- β_2 -0 мыши, получившие инъекцию CD34⁺-клеток от пациента с X-сцепленной хронической гранулематозной болезнью (gp91^{phox}-недостаточность), продуцировали человеческие нейтрофилы с дефектом оксидазной активности. Трансплантация X-CDG CD34⁺-клеток с трансдукцией лентивируса, содержащего gp91^{phox} ген, восстанавливала оксидазную активность человеческих нейтрофилов [92]. Таким образом, NOD-SCID мыши могут служить моделью для разработки средств лечения человеческих гемопоэтических заболеваний.

Гуманизированные SCID мыши

Для оптимизации гемопоэтического микроокружения человеческих клеток у иммунодефицитных мышей была выведена линия гуманизированных SCID-hu мышей. Изначально фрагменты человеческого плодного тимуса были имплантированы под почечную капсулу SCID мыши с последующей инъекцией CD34⁺-клеток человека. Результатом была продукция циркулирующих человеческих Т-лимфоцитов и миелоидных клеток в относительно короткий период [93]. SCID-hu Thy/Liv модель представляет усовершенствование этой системы, в которой и человеческий плодный тимус, и печень плода трансплантируются под капсулу почки SCID мыши. У большинства этих животных человеческие клетки и Т-клетки лимфоцитарной и миелоидной линий определяются в периферической крови животных в период от 6 до 12 мес. [94]. Исследование трансплантированных органов выявило наличие в них человеческих гемопоэтических гранулоцитарно-макрофагальных колониеформирующих клеток (CFU-GM) и примитивных человеческих эритроидных бурстформирующих единиц (BFU-E) [94]. Кроме того, эти животные содержали полный набор дифференцированных человеческих Т-лимфоцитов, включая CD3⁺/CD4⁺ CD8⁺, CD3⁺/CD4⁻ CD8⁺ и CD3⁺/CD4⁺

CD8⁺-клетки [95]. Обычно человеческие Т-клетки у иммунодефицитной мыши вызывают тяжелую летальную РТПХ [96]. Однако трансплантаты человеческого тимуса у SCID-hu Thy/Liv мыши, как было показано, содержали мышинные дендритные клетки, что объясняет и толерантность, и долговременную продукцию человеческих Т-лимфоцитов без РТПХ [97].

Окончательным усовершенствованием SCID-hu линии является SCID-hu костная модель. В этой модели фрагменты фетальных костей человека трансплантируются подкожно SCID мыши. Костные фрагменты васкуляризируются в течение 4–6 нед., обеспечивая «человеческое» гемопозитическое микроокружение, в котором небольшое количество человеческих миелоидных предшественников и В-клеток могут поддерживаться в течение 12 нед. и более [98]. SCID мыши с фрагментами фетальных костей, тимуса и селезенки (BTS) человека известны как SCID-hu BTS мыши. SCID-hu BTS мыши могут поддерживать ГСК человека всех линий в течение 36 нед. и более [99]. Более того, костные фрагменты могут вводиться прямо с очищенными гемопозитическими клетками, что в последующем может повлиять на их способность к восстановлению популяции и пролиферации. SCID-hu BTS модель используется

для определения фенотипа большинства примитивных человеческих ГСК. CD34⁺/Lin⁻/Thy-1⁺-клетки, введенные в человеческий костный фрагмент у SCID-hu BTS мыши, были обогащены клетками, которые генерируют гемопозитические клетки-предшественницы и зрелые клетки [99, 100].

Заключение

Развитие животных моделей, в которых ГСК человека могут приживляться и пролиферировать, имело фундаментальное значение в изучении гемопоза человека. Относительные достоинства каждой из моделей, описанных выше, представлены в таблице. Общим для всех указанных моделей является то, что наивысший уровень приживания получен с клетками пуповинной крови, далее с костномозговыми клетками и, наконец, с мобилизованными клетками периферической крови [41–43, 101–104]. Однако, несмотря на прогресс, достигнутый за годы исследований, причина относительно низкого уровня человеческих клеток, генерируемых в этих моделях, до сих пор не ясна. Но, оценивая прогресс за последние 5 лет, можно сделать вывод, что эта проблема будет решена за счет средств генной инженерии.

Сравнение экспериментальных моделей для исследования приживания ГСК костного мозга человека

Животное-реципиент	Длительность жизнеобеспечения ГСК человека	Сложность выполнения трансплантации	Потребность в экзогенных цитокинах	Практичность
Плоды овец	До 4 лет	Да	Да	Низкая
BNX мыши	До 6 мес.	Нет	Обеспечиваются процессированной донорской стромой	Высокая
SCID мыши	12–16 нед.	Нет	Да	Высокая
SCID-hu мыши	До 6 мес.	Да	Нет	Средняя

ЛИТЕРАТУРА

- Zanjani E.D., Almeida-Porada G., Flake A.W. The human/sheep xenograft model: a large animal model of human hematopoiesis. *Int. J. Hematol.* 1996; 63: 179–92.
- Zanjani E.D., Almeida-Porada G., Ascensao J.L. et al. Transplantation of hematopoietic stem cells in utero. *Stem Cells* 1997; 15: 79–92.
- Zanjani E.D. The human sheep xenograft model for the study of the in vivo potential of human HSC and in utero gene transfer. *Stem Cells* 2000; 18: 151.
- Mosier D.E. Humanizing the mouse. *Semin. Immunol.* 1996; 8: 185–268.
- Dick J.E. Human stem cell assays in immune-deficient mice. *Curr. Opin. Hematol.* 1996; 3: 405–9.
- Dao M.A., Nolte J.A. Use of the bnx/hu xenograft model of human hematopoiesis to optimize methods for retroviral-mediated stem cell transduction. *Int. J. Mol. Med.* 1998; 1: 257–64.
- Morrison S., Uchida N., Weissman I. The biology of hematopoietic stem cells. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.* 1995; 1: 35–71.
- Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993; 81: 2844–53.
- Orlic D., Bodine D.M. What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): Will the real PHSC please stand up? *Blood* 1994; 84: 3991–4.
- Weissman I.L. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 2000; 287: 1442–6.
- Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F. et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105–11.
- Micklem H.S., Ford C.E., Evans E.P. et al. Competitive in vivo proliferation of foetal and adult haematopoietic cells in lethally irradiated mice. *J. Cell. Physiol.* 1972; 79: 293–303.
- Harrison D.E. Competitive repopulation: A new assay for long-term stem cell functional capacity. *Blood* 1980; 55: 77–81.

- Visser J.W., Bauman J.G., Mulder A.H. et al. Isolation of murine pluripotent hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 1984; 59: 1576–90.
- Spangrude G.J., Heimfeld S., Weissman I.L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 1988; 241: 58–62.
- Matthews W., Jordan C.T., Wiegand G.W. et al. A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell* 1991; 65: 1143–52.
- Orlic D., Fischer R., Nishikawa S. et al. Purification and characterization of heterogeneous pluripotent hematopoietic stem cell populations expressing high levels of c-kit receptor. *Blood* 1993; 82: 762–70.
- Morrison S.J., Weissman I.L. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1994; 8: 661–73.
- Jordan C.T., Lemischka I.R. Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse. *Genes Dev.* 1990; 4: 220–08.
- Turhan A.G., Humphries R.K., Phillips G.L. et al. Clonal hematopoiesis demonstrated by X-linked DNA polymorphisms after allogeneic bone marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.* 1989; 320: 1655–61.
- Brenner M.K., Rill D.R., Holladay M.S. et al. Gene marking to determine whether autologous marrow infusion restores long-term haematopoiesis in cancer patients. *Lancet* 1993; 342: 1134–7.
- Dunbar C.E., Cottier-Fox M., O'Shaughnessy J.A. et al. Retrovirally marked CD34-enriched peripheral blood and bone marrow cells contribute to long-term engraftment after autologous transplantation. *Blood* 1995; 85: 3048–57.
- Kohn D.B., Weinberg K.I., Nolte J.A. et al. Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. *Nat. Med.* 1995; 1: 1017–23.

24. Dexter T.M., Lajtha L.G. Proliferation of haematopoietic stem cells in vitro. *Br. J. Haematol.* 1974; 28: 525–30.
25. Sutherland H.J., Lansdorp P.M., Henkelman D.H. et al. Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal cells. *PNAS USA* 1990; 87: 3584–8.
26. Hao Q.L., Thiemann F.T., Peterson D. et al. Extended long-term culture reveals a highly quiescent and primitive human hematopoietic progenitor population. *Blood* 1996; 88: 3306–13.
27. Harrison D.E., Lerner C.P., Spooncer E. Erythropoietic repopulating ability of stem cells from long-term marrow cultures. *Blood* 1987; 69: 1021–5.
28. Szilvassy S.J., Humphries R.K., Lansdorp P.M. et al. Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. *PNAS USA* 1990; 87: 8736–40.
29. Billingham R., Brent L., Medawar P.B. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 1953; 172: 603–06.
30. Billingham R., Brent L., Medawar P.B. Quantitative studies on tissue transplantation immunity. III. Actively acquired tolerance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 1956; B239: 357–69.
31. Binns R. Bone marrow and lymphoid cell injection of the pig fetus resulting in transplantation tolerance or immunity, and immunoglobulin production. *Nature* 1967; 214: 179–80.
32. Shultz L.D. Hematopoiesis and models of immunodeficiency in the mouse. *Semin. Immunol.* 1991; 3: 397–408.
33. Shultz L.D. Immunological mutants of the mouse. *Am. J. Anat.* 1991; 191: 303–11.
34. Flake A.W., Harrison M.R., Adzick N.S. et al. Transplantation of fetal hematopoietic cells in utero: The creation of hematopoietic chimeras. *Science* 1986; 233: 776–8.
35. Zanjani E.D., Pallavicini M.G., Ascensao J.L. et al. Engraftment and long-term expression of human fetal hematopoietic stem cells in sheep following transplantation in utero. *J. Clin. Invest.* 1992; 89: 1178–88.
36. Zanjani E.D., Ascensao J.L., Tavassoli M. Liver-derived fetal hemopoietic stem cells selectively and preferentially home to the fetal bone marrow. *Blood* 1993; 81: 399–404.
37. Zanjani E.D., Flake A.W., Rice H.E. et al. Long term repopulation ability of xenogeneic transplanted human fetal liver hematopoietic stem cells (HSC) in sheep. *J. Clin. Invest.* 1994; 93: 1051–5.
38. Zanjani E.D., Ascensao J.L., Harrison M.R. et al. Ex vivo incubation with growth factors enhances the engraftment of fetal hemopoietic stem cells transplanted in sheep fetuses. *Blood* 1992; 79: 3045–9.
39. Flake A.W., Hendrick M.H., Rice H.E. et al. Enhancement of human hematopoiesis by mast cell growth factor in human-sheep chimeras created by the in utero transplantation of human fetal hematopoietic cells. *Exp. Hematol.* 1995; 23: 252–7.
40. Srour E.F., Zanjani E.D., Brandt J.E. et al. Sustained human hematopoiesis in sheep transplanted in utero during early gestation with fractionated adult human bone marrow cells. *Blood* 1992; 79: 1404–12.
41. Srour E.F., Zanjani E.D., Cornetta K. et al. Persistence of human multilineage, self renewing lymphohematopoietic stem cells in chimeric sheep. *Blood* 1993; 82: 3333–42.
42. Zanjani E.D., Srour E.F., Hoffman R. Retention of long-term repopulating ability of xenogeneic transplanted purified adult human bone marrow hematopoietic stem cells in sheep. *J. Lab. Clin. Med.* 1995; 126: 24–8.
43. Cromblehoime T.M., Harrison M.R., Zanjani E.D. In utero transplantation of hematopoietic cells in sheep: The role of T cells in engraftment and graft-vs-host disease. *J. Pediatr. Surg.* 1990; 25: 885–92.
44. Civin C.I., Almeida-Porada G., Lee M.J. et al. Sustained, retransplantable, multi-lineage engraftment of highly purified adult human bone marrow stem cells in vivo. *Blood* 1996; 88: 4102–9.
45. Almeida-Porada G., Porada C.D., Tran N. et al. Cotransplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation. *Blood* 2000; 95: 3620–7.
46. Yin A.H., Miraglia S., Zanjani E.D. et al. AC 133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997; 90: 5002–12.
47. Bhatia M., Bonnet D., Murdoch B. et al. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat. Med.* 1998; 4: 1038–45.
48. Zanjani E.D., Almeida-Porada G., Livingston A.G. et al. Human bone marrow CD34-cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34⁺ cells. *Exp. Hematol.* 1998; 26: 353–60.
49. Verfaillie C.M., Almeida-Porada G., Wissink S. et al. Kinetics of engraftment of CD34(–) and CD34(+) cells from mobilized blood differs from that of CD34(–) and CD34(+) cells from bone marrow. *Exp. Hematol.* 2000; 28: 1071–9.
50. Sutherland D.R., Yeo E.L., Stewart K. et al. Identification of CD34⁺ subsets after glycoprotease selection: Engraftment of CD34⁺/Thy1⁺/Lin[–] stem cells in fetal sheep. *Exp. Hematol.* 1996; 24: 795–806.
51. Uchida N., Combs J., Chen S. et al. Primitive human hematopoietic cells displaying differential efflux of the Rhodamine 123 dye have distinct biological activities. *Blood* 1996; 88: 1297–305.
52. Kawashima I., Zanjani E.D., Almeida-Porada G. et al. CD34⁺ human marrow cells that express low levels of Kit protein are enriched for long-term marrow engrafting cells. *Blood* 1996; 87: 4136–42.
53. Uribe L., Weinberg K.I. X-linked SCID and other defects of cytokine pathways. *Semin. Hematol.* 1998; 35: 299–309.
54. Tsai E.J., Malech H.L., Kirby M.R. et al. Retroviral transduction of IL2RG into CD34(+) cells from X-linked severe combined immunodeficiency patients permits human T- and B-cell development in sheep chimeras. *Blood* 2002; 100: 72–9.
55. Cavazzana-Calvo M., Hacein-Bey S., de Saint Basile G. et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000; 288(5466): 669–72.
56. Hacein-Bey-Abina S., Le Deist F., Carlier F. et al. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N. Engl. J. Med.* 2002; 346(16): 1185–93.
57. Hacein-Bey-Abina S., von Kalle C., Schmidt M. et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 255–6.
58. Barbosa M.D., Nguyen Q.A., Tchernev V.T. et al. Identification of the homologous beige and Chediak-Higashi syndrome genes. *Nature* 1996; 382: 262–5.
59. Perou C.M., Moore K., Nagle D.L. et al. Identification of the murine beige gene by YAC complementation and positional cloning. *Nat. Genet.* 1996; 13: 303–8.
60. Flanagan S. «Nude,» a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet. Res.* 1966; 8: 295–309.
61. Nehls M., Pfeifer D., Schorpp M. et al. New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. *Nature* 1994; 372: 103–7.
62. Segre J.A., Nemhauser J.L., Taylor B.A. et al. Positional cloning of the nude locus: Genetic, physical, and transcription maps of the region and mutations in the mouse and rat. *Genomics* 1995; 28: 549–59.
63. Scher I. The CBA/N mouse strain: An experimental model illustrating the influence of the X-chromosome on immunity. *Adv. Immunol.* 1982; 33: 1–71.
64. Thomas J.D., Sideras P., Smith C.I. et al. Colocalization of X-linked agammaglobulinemia and X-linked immunodeficiency genes. *Science* 1993; 261: 355–8.
65. Rawlings D.J., Saffran D.C., Tsukada S. et al. Mutation of the unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. *Science* 1993; 261: 358–61.
66. Kamel-Reid S., Dick J.E. Engraftment of immune-deficient mice with human hematopoietic stem cells. *Science* 1988; 242: 1706–9.
67. Nolte J.A., Hanley M.B., Kohn D.B. Sustained human hematopoiesis in immunodeficient mice by cotransplantation of marrow stroma expressing human interleukin-3: Analysis of gene transduction of long-lived progenitors. *Blood* 1994; 83: 3041–51.
68. Arakawa-Hoyt J., Dao M.A., Thiemann F. et al. The number and generative capacity of human B lymphocyte progenitors, measured in vitro and in vivo, is higher in umbilical cord blood than in adult or pediatric bone marrow. *Bone Marrow Transplant.* 1999; 24: 1167–76.
69. Nolte J.A., Dao M., Wells S. et al. Transduction of pluripotent human hematopoietic stem cells demonstrated by clonal analysis after engraftment in immune deficient mice. *PNAS USA* 1996; 93: 2414–9.
70. Schmidt M., Hoffmann G., Wissler M. et al. Detection and direct genomic sequencing of multiple rare unknown flanking DNA in highly complex samples. *Hum. Gene Ther.* 2001; 12: 743–9.
71. Blunt T., Finnic N.J., Taccioli G.E. et al. Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. *Cell* 1995; 80: 813–23.
72. Lapidot T., Pflumio F., Doedens M. et al. Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in sad mice. *Science* 1992; 255: 1137–41.
73. Shultz L., Schweitzer P., Christianson S. et al. Multiple defects in innate and adaptive immunological function in NOD/LtSz-scid mice. *J. Immunol.* 1995; 154: 180–91.
74. Gan O.I., Dorrell C., Pereira D.S. et al. Characterization and retroviral transduction of an early human lymphomyeloid precursor assayed in nonswitched long-term culture on murine stroma. *Exp. Hematol.* 1999; 27: 1097–106.
75. Larochelle A., Vormoor J., Lapidot T. et al. Engraftment of immune-deficient mice with primitive hematopoietic cells from beta-thalassemia and sickle cell anemia patients: Implications for evaluating human gene therapy protocols. *Hum. Mol. Genet.* 1995; 4: 163–72.
76. Lowry P.A., Shultz L.D., Greiner D.L. et al. Improved engraftment of human cord blood stem cells in NOD/LtSz-scid/scid mice after irradiation or multiple-day injections into unirradiated recipients. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 1996; 2: 15–23.

77. Pflumio F., Izac B., Katz A. et al. Phenotype and function of human hematopoietic cells engrafting immune-deficient CB17-severe combined immunodeficiency mice and nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency mice after transplantation of human cord blood mononuclear cells. *Blood* 1996; 88: 3731–40.
78. Prochazka M., Gaskins H.R., Shultz L.D. et al. The nonobese diabetic scid mouse: Model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency. *PNAS USA* 1992; 89: 3290–4.
79. Kollet O., Peled A., Byk T. et al. Beta2 microglobulin-deficient [B2m(null)] NOD/ SCID mice are excellent recipients for studying human stem cell function. *Blood* 2000; 95: 3102–5.
80. Dick J.E., Bhatia M., Can O. et al. Assay of human stem cells by repopulation of NOD/SCID mice. *Stem Cells* 1997; 15(Sup.1): 199–203.
81. Hao Q.L., Shah A.J., Thiemann F.T. et al. A functional comparison of CD34⁺ CD38⁻ cells in cord blood and bone marrow. *Blood* 1995; 86: 3745–53.
82. Guenechea G., Gan O., Inamitsu T. et al. Transduction of human CD34⁺ CD38⁻ bone marrow and cord blood-derived SCID-repopulating cells with third-generation lentiviral vectors. *Mol. Ther.* 2000; 1(6): 566–73.
83. Dao M.A., Shah A.J., Crooks G.M. et al. Engraftment and retroviral marking of CD34⁺ and CD34⁺CD38⁻ human hematopoietic progenitors assessed in immune-deficient mice. *Blood* 1998; 91: 1243–55.
84. Guenechea G., Gan O., Dorrell C. et al. Distinct classes of human stem cells that differ in proliferative and self-renewal potential. *Nat. Immunol.* 2001; 2: 75–82.
85. Dao M.A., Arevalo J., Nolte J.A.. Reversibility of CD34 expression on human hematopoietic stem cells that retain the capacity for secondary reconstitution. *Blood* 2003; 101: 112–8.
86. Josephson N.C., Vassilopoulos G., Trobridge G.D. et al. Transduction of human NOD/SCID-repopulating cells with both lymphoid and myeloid potential by foamy virus vectors. *PNAS USA* 2002; 99: 8295–300.
87. Kamel-Reid S., Letarte M., Sirard C. et al. A model of human acute lymphoblastic leukemia in immune-deficient SCID mice. *Science* 1989; 246: 1597–600.
88. Kamel-Reid S., Letarte M., Doedens M., et al. Bone marrow from children in relapse with pre-B acute lymphoblastic leukemia proliferates and disseminates rapidly in scid mice. *Blood* 1991; 78: 2973–81.
89. Wang J.C., Lapidot T., Cashman J.D. et al. High level engraftment of NOD/ SCID mice by primitive normal and leukemic hematopoietic cells from patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Blood* 1998; 91: 2406–14.
90. Bonnet D., Dick J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 1997; 3: 730–7.
91. Dick J.E. Normal and leukemic human stem cells assayed in SCID mice. *Semin. Immunol.* 1996; 8: 197–206.
92. Roesler J., Brenner S., Bukovsky A.A. et al. Third-generation, self-inactivating gp91(phox) lentivector corrects the oxidase defect in NOD/SCID mouse-repopulating peripheral blood-mobilized CD34⁺ cells from patients with X-linked chronic granulomatous disease. *Blood* 2002; 100: 4381–90.
93. McCune J.M., Namikawa R., Kaneshima H. et al. The SCID-hu mouse: Murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* 1988; 241: 1632–9.
94. Namikawa R., Weilbaecher K.N., Kaneshima H. et al. Long-term human hemato-poiesis in the SCID-hu mouse. *J. Exp. Med.* 1990; 172: 1055–63.
95. Krowka X., Sarin S., Namikawa R. et al. The human T cells of the SCID-hu mouse are phenotypically normal and functionally competent. *J. Immunol.* 1991; 145: 3751–6.
96. Pflumio F., Lapidot T., Murdoch B. et al. Engraftment of human lymphoid cells into newborn SCID mice leads to graft-versus-host disease. *Int. Immunol.* 1993; 5: 1509–22.
97. Vandekerckhove B.A., Namikawa R., Bacchetta R. et al. Human hematopoietic cells and thymic epithelial cells induce tolerance via different mechanisms in the SCID-hu mice. *J. Exp. Med.* 1992; 175: 1033–40.
98. Kyoizumi S., Baum C., Kaneshima H. et al. Implantation and maintenance of functional human bone marrow into SCID-hu mice. *Blood* 1992; 79: 1704–11.
99. Fraser C., Kaneshima H., Hanstee G. et al. Human allogeneic stem cell maintenance and differentiation in a long-term multilineage SCID-hu graft. *Blood* 1995; 86: 1680–93.
100. Kollmann T., Kim A., Zhuang X. et al. Reconstitution of SCID mice with human lymphoid and myeloid cells after transplantation with human fetal bone marrow without the requirement for exogenous human cytokines. *PNAS USA* 1994; 91: 8032–6.
101. Vormoor J., Lapidot T., Pflumio F. et al. Immature human cord blood progenitors engraft and proliferate to high levels in severe combined immunodeficient mice. *Blood* 1994; 83: 2489–97.
102. Lansdorp P.M., Dragowska W., Mayani H. Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. *J. Exp. Med.* 1993; 178: 787–91.
103. Chen B.P., Galy A., Kyoizumi S. et al. Engraftment of human hematopoietic precursor cells with secondary transfer potential in SCID-hu mice. *Blood* 1994; 84: 2497–505.
104. Murray L., Chen B., Galy A. et al. Enrichment of human hematopoietic stem cell activity in the CD34⁺Thy1⁺Lin⁻ subpopulation from mobilized peripheral blood. *Blood* 1995; 85: 368–78.

Поступила 31.03.2014