

## Существуют ли ткане–специфичные стволовые клетки костного мозга?

Гипотеза о так называемых ткане–специфичных стволовых клетках (ТССК) костного мозга подразумевает наличие популяции, способной давать специализированные клетки определённой ткани и/или активно участвовать в её репаративной регенерации. Существование таких клеток позволило бы ученым селективно изолировать их из костного мозга и использовать в лечении повреждения конкретной ткани или органа. Основной предпосылкой к возникновению такой гипотезы послужили многочисленные работы, показывающие участие клеток костного мозга в репаративной регенерации органов через клеточное слияние, трансдифференцировку, паракринные и проангиогенетические механизмы.

Рядом исследователей были предложены кандидаты в ТССК костного мозга. Так, Avital в 2001 году [1] предположил, что именно  $\beta(2)\text{microglobulin}(-)/\text{Thy-1}(+)$  клетки в костном мозге крысы и человека могут быть селективными прогениторами для печени. На очищенной популяции была показана экспрессия характерных для печени генов. После их введения в печень крысы «гепатоцитарные» стволовые клетки костного мозга интегрировались с клетками органа и дифференцировались в зрелые гепатоциты [1]. Однако, позднее оказалось, что не только  $\beta(2)\text{microglobulin}(-)/\text{Thy-1}(+)$ , но и другие – не адгезивные к пластику клетки костного мозга способны к синтезу альбумина и мочевины, хотя первые обладают значительно большим потенциалом [2]. Другой группой исследователей было установлено, что негемопозитические  $\text{CXCR4}+/\text{Sca-1}+/\text{lin-}/\text{CD45-}$  клетки костного мозга мыши экспрессируют «ранние сердечные» маркеры и мобилизуются в периферический кровоток при развитии инфаркта миокарда [3]. Гипотеза появления в костном мозге клеток, спонтанно экспрессирующих ткане–специфичные гены при повреждении какого–либо органа, была развита группой Kucia M [3, 4].

Новое исследование группы Kucia по выделению ТССК костного мозга с нейрогенным потенциалом было опубликовано в журнале *Leukemia*. Авторы предположили, что в костном мозге мышей существует отдельная популяция, клетки которой способны к формированию нейросфер в культуре и обладают нейрорегенеративным потенциалом.

Исследователи показали, что именно  $\text{CXCR4}+/\text{Sca-1}+/\text{lin-}/\text{CD45-}$  клетки являются кандидатами для нейрогенных ТССК костного мозга молодых мышей. Клетки только этой популяции спонтанно экспрессировали нейрональные маркеры, в отличие контрольных – суммарных фракций мононуклеарных и  $\text{Sca-1}+$  клеток костного мозга. Эти клетки не образовывали гемопозитические колонии *in vitro* и отлично подвергались хемотаксису по различным градиентам (SDF–1, HGF, и LIF). Только эта популяция клеток давала первичные и вторичные нейросферы *in vitro* в процессе их культивирования в дифференцировочной среде NeuroCult (SCT). Через неделю культивирования клетки нейросфер экспрессировали все классические нейрональные маркеры – нейронов ( $\text{nestin}$ ,  $\beta\text{-III-tubulin}$ ), олигодендроцитов (O4, MBP) и микроглии (GFAP).

На модели повреждения головного мозга (инсульт) было показано, что в периферическом кровотоке мышей появляются мононуклеарные ТССК костного мозга, экспрессирующие

нейрональные маркеры, чего не наблюдали в контроле (без инсульта). Эти данные также подтверждают вывод о выходе ТССК из костного мозга в кровоток при повреждении ткани, сделанном в прошлых работах [5, 6].

Тесты на хемотаксис с супернатантом повреждённой ткани мозга позволили идентифицировать нейрогенные ( $\text{GFAP}+/\text{nestin}+$ ) и эндотелиальные ( $\text{VE-cadherin}+$ ) ТССК среди мононуклеаров. Однако, эти ТССК не экспрессировали маркеров мышечной ткани. Вместе с тем, в ткани повреждённого головного мозга была значительно повышена экспрессия молекул, ответственных за миграцию и хемотаксис клеток (SDF–1, HGF, и LIF). Интересно, что количество таких ТССК и их миграционная способность значительно снижались с возрастом.

Авторы работы впервые попытались идентифицировать нейрогенную популяцию ткане–специфичных стволовых клеток костного мозга. Интересно, что спонтанная экспрессия нейрональных маркеров различными клеточными популяциями костного мозга была показана и в предшествующих работах [7, 8]. В настоящем же исследовании авторы показали изменение уровня спонтанной экспрессии нейрональных маркеров клетками костного мозга, её зависимость от повреждения нервной ткани. Эти результаты могут иметь важное значение для понимания процессов миграции клеток костного мозга в повреждённую нервную ткань и дают возможность изучать эффективность терапевтической регенерации нервной ткани с помощью ТССК.

Результаты исследования позволяют глубже понять участие клеток костного мозга в процессе регенерации ткани в целом. Итак, согласно гипотезе, ТССК присутствуют в постнатальном костном мозге млекопитающих [1–6] и характеризуются спонтанной экспрессией ряда тканевых маркеров [1–8]. При повреждении ткани в ТССК усиливается экспрессия маркеров именно той ткани, которая была повреждена. Эти ТССК коэкспрессируют молекулы хемотаксиса ( $\text{CXCR4}+$ ) и мобилизуются в кровоток при избыточной экспрессии лигандов–хемоаттрактантов (SDF–1, HGF, и LIF) в повреждённой ткани [3–6]. И именно ТССК участвуют в репаративной регенерации ткани.

Тем не менее, на сегодняшний день нельзя однозначно заявлять о существовании ТССК, поскольку спонтанная экспрессия (например) нейрональных маркеров была показана совершенно для разных групп клеток [7, 8], и в тестах по хемотаксису, миграции и нейродифференцировке отсутствовали адекватные контроли. Кроме того, в репаративной регенерации ткани возможна «конкуренция» между  $\text{CXCR4}+$  ТССК и зрелыми клетками крови – моноцитами/макрофагами и лимфоцитами, также мигрирующими из костного мозга [9]. Вклад ТССК в регенерацию ткани остаётся неясным. Возможно, что эти клетки организм использует и в процессе физиологической регенерации для замены зрелых клеток, погибших путем апоптоза. Для ответа на эти вопросы нужны дополнительные эксперименты. Тем не менее, если исследователи смогут точно идентифицировать ТССК, то их практическое значение в клинике может быть велико. Возможно их использование для регенерации поврежденной ткани при серьезных заболеваниях.

## ЛИТЕРАТУРА:

1. Avital I., Inderbitzin D., Aoki T. et al. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 288(1): 156–64.
2. Inderbitzin D., Avital I., Gloor B. et al. Functional comparison of bone marrow-derived liver stem cells: selection strategy for cell-based therapy. *J. Gastrointest. Surg.* 2005; 9(9): 1340–5.
3. Kucia M., Dawn B., Hunt G. et al. Cells expressing early cardiac markers reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood after myocardial infarction. *Circ. Res.* 2004; 95(12): 1191–9.
4. Kucia M., Ratajczak J., Reza R. et al. Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury. *Blood Cells Mol. Dis.* 2004; 32(1): 52–7.
5. Wojakowski W., Tendera M., Michalowska A. et al. Mobilization of CD34/CXCR4<sup>+</sup>, CD34/CD117<sup>+</sup>, c-met<sup>+</sup> stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circ.* 2004; 110: 3213–20.
6. Kucia M., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. Bone marrow as a source of circulating CXCR4<sup>+</sup> tissue-committed stem cells. *Biol. Cell* 2005; 97: 133–46.
7. Goolsby J., Marty M.C., Heletz D. et al. Hematopoietic progenitors express neural genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100(25): 14926–31.
8. Tondreau T., Lagneaux L., Dejeneffe M. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation* 2004; 72(7): 319–26.
9. Willenbring H., Bailey A.S., Foster M. et al. Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver. *Nat. Med.* 2004; 10: 7: 744–8.

Подготовил А.Л. Поспелов  
По материалам *Leukemia* 2006; 20: 18–28

## Создание функциональной ткани молочной железы из одной стволовой клетки

Идея о существовании стволовых клеток эпителия молочной железы (СКМЖ) возникла еще в начале 60-х гг. прошлого века, однако, её экспериментальные подтверждения стали появляться лишь в последние годы [1]. В 1998 г. Kordon и Smith произвели серийные трансплантации фрагментов эпителиальной ткани железы мышей и показали, что в ткани железы присутствуют клетки, которые способны самообновляться и могут полностью воспроизводить эпителиальную ткань молочной железы (МЖ) в нескольких поколениях [1]. Интерес к СКМЖ стал возрастать с появлением работ, в которых говорится о вкладе этих клеток в злокачественное перерождение эпителия МЖ [2]. Однако точная идентификация популяции стволовых клеток молочной железы оставалась невыполненной задачей, т.к. не было предложено биохимических и функциональных маркеров, хорошо характеризующих эти клетки.

В совместной международной работе американских, австралийских и канадских ученых, опубликованной в журнале *Nature*, достоверно показано получение функционирующей ткани молочной железы из собственных СКМЖ мыши *in vivo*. Ученые впервые выделили популяцию истинных клоногенных мультипотентных СКМЖ, способную к самообновлению.

Выделение интересующей популяции клеток производилось с использованием флуоресцентного сортирования из тотального гомогената ткани МЖ, обработанного ферментами. Изолированные Lin<sup>-</sup> и Lin<sup>+</sup> клетки были подсажены в междольковую жировую ткань. Эффективность трансплантации измерялась по частоте формирования репопулирующих единиц железы (mammary repopulating 'units' (MRUs)). MRU формировались только после трансплантации Lin<sup>-</sup> клеток, которые были разделены на четыре субпопуляции на основе экспрессии CD29 (β-1-integrin) и CD24 (heat-stable antigen). Экспрессия этих маркеров известна для нейрональных стволовых клеток и опухолей МЖ [2]. Эффективность и частота формирования MRU той или иной фракцией выяснялась после сортирования клеток и их последующей пересадки. Так, было показано, что трансплантация только Lin<sup>-</sup>/CD29hi/CD24<sup>+</sup> популяции приводила к стабильному формированию MRU – в восемь раз чаще, чем при всех остальных вариантах.

Функционально активная (лактлирующая) железа образована дольками, состоящими из альвеол, между которыми в рыхлой волокнистой соединительной ткани располагаются внутридольковые протоки и жировые клетки. Существует три субпопуляции, предположительно происходящие от единого предшественника (стволовой клетки эпителия молочной железы) – миоэпителиоциты, эпителий протоков МЖ и альвеолярный железистый эпителий. Ранее было показано присутствие участков ткани МЖ богатых клетками-предшественниками как для мышей [3], так и для человека [4, 5]. Для последующей характеристики выявленной популяции она была исследована на экспрессию специфических маркеров ткани железы – СК14 – миоэпителиальный маркер и СК18 – белок, характерный для эпителия просвета протока МЖ. Оказалось, что практически все Lin<sup>-</sup>/CD29hi/CD24<sup>+</sup> несут СК18, в то время как СК14 появляется лишь на единичных клетках, часто совместно локализуясь с СК18. Для проверки способности исследуемых клеток к дифференцировке были проведены опыты в Матригеле и лактогенной среде. В 85% случаев формировались альвеолярно-подобные структуры, клетки которых секретировали белки молока.

Для подтверждения гипотезы «единого предшественника» меченые Lin<sup>-</sup>/CD29hi/CD24<sup>+</sup> клетки были разведены для инъекции из расчета «одна клетка на инъекцию». В 8 случаях из 68 были получены LacZ<sup>+</sup> эпителиальные образования. Гистохимическое исследование таких образований выявило нормальную морфологию протоков и их стандартный клеточный состав. Функционирование таких новообразованных единиц у беременных особей не отличалось от остальной (своей) ткани железы – в просвете протоков выявлялись липидные капли и агрегаты белков молока. Способность к самообновлению была подтверждена опытами с последовательными пересадками одной и той же популяции. Таким образом, истинной СКМЖ авторы работы называют клоногенную самообновляющуюся, мультипотентную клетку с Lin<sup>-</sup>/CD29hi/CD24<sup>+</sup> фенотипом.

В связи с развитием гипотезы возможного участия взрослых стволовых клеток в канцерогенезе были проведены эксперименты по экспрессии CD24 и CD29 гиперплазированными, но еще не злокачественными клетками мышей двух мутантных линий. В результате оказалось, что