

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние трихостатина А на нейрональную дифференцировку стромальных клеток костного мозга взрослого человека

И.А. Чистякова¹, И.В. Галанин², К.П. Гайдаенко³, Т.А. Скоромец²,
А.Ф. Гурчин³, Г.П. Пинаев¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

² ГУ НИПНИ им. В.М. Бехтерева, Санкт-Петербург

³ Институт мозга человека РАН, Санкт-Петербург

An influence of trichostatin a on neuronal differentiation of human bone marrow stromal cells

I.A. Chistyakova¹, I.V. Galanin², K.P. Gaydaenko³, T.A. Skoromets², A.F. Gurchin³, G.P. Pinaev¹

¹ Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg

² V.M. Bechterev psychoneurology institute, Saint-Petersburg

³ Human brain institute RAS, Saint-Petersburg

Исследования последних лет показали способность стромальных клеток костного мозга, относящихся к мультипотентным мезенхимальным стромальным клеткам (ММСК), к дифференцировке в неортодоксальных направлениях, в клетки, имеющие эктодермальное или энтодермальное происхождение. В частности, была обнаружена возможность индукции нейронального фенотипа с помощью факторов роста или химических агентов. Однако, многие вопросы, касающиеся нейрональной дифференцировки ММСК, остаются спорными. В первую очередь это касается соответствия получаемых клеток нервным клеткам, так как механизмы дифференцировки исследованы недостаточно. Мы предприняли попытку выявить нейрогенные эффекты ретиноевой кислоты (РК) – нативного эмбрионального морфогена – на ММСК путем гистоновой ацетилирования. Были использованы два протокола комбинированной обработки ММСК РК и специфическим ингибитором гистоновых деацетилаз трихостатином А (ТСА). В одном случае клетки регулярно обрабатывали ТСА и РК. Согласно другому протоколу, ТСА вводили однократно при первой обработке ММСК РК. При обоих способах индукции на 12-е сут. наблюдалась массовая (50–70%) морфологическая перестройка фибробластоподобных клеток в нейроноподобные, хотя по отдельности ни РК, ни ТСА не вызывали дифференцировочных эффектов. Иммунофлуоресцентный анализ показал увеличение иммунореактивности к нейрональным маркерным белкам NF-M и τ -1 в нейроноподобных клетках. Таким образом, ТСА индуцирует РК-зависимую нейрональную дифференцировку ММСК. Наблюдаемые морфологические и фенотипические эффекты могут отражать нейрогенные влияния РК на стромальные клетки.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, нейрональная дифференцировка, трихостатин А, ретиноевая кислота.

Введение

С того времени, как было обнаружено, что стромальные клетки, или мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), изолированные из костного мозга человека, могут быть дифференцированы *in vitro* в нейроноподобные клетки под влиянием химических агентов и/или факторов роста, они представляются привлекательной альтернативой эмбриональным прогениторным нервным клеткам. Однако до сих пор сохраняются сомнения и даже скептицизм относительно идентичности получаемых нейроноподобных клеток нервным [1]. Во многих протоколах для индукции используются химические вещества с неизвестным механизмом действия, такие как β -меркаптоэтанол, диметилсульфоксид,

During the last years it has been shown that bone marrow stromal cells, which were earlier designated as mesenchymal stem cells (MSC), can differentiate at nonorthodoxal way in particular into cells which have endodermal or ectodermal origin. Thus, the possibility of induction of neuronal phenotype by growth factors and chemical agents has been revealed. However many questions concerning neuronal differentiation of MSC remain controversial. First of all it is conformity of differentiated stromal cells to nerve cells, since the mechanism of the differentiation remain unclear. Here we had attempt to reveal neurogenic effects of retinoic acid (RA), a native embryonic morphogen, on MSC by histone acetylation. We used two protocols of combined treatment MSC with RA and trichostatin A (TSA), a specific inhibitor of histone deacetylase. In the one case the cells treated with RA and TSA regularly. According to other protocol TSA was added to culture medium only once with first treatment MSC with RA. In the both ways of induction we observed at day 12 a transformation of 50–70% fibroblastoid stromal cells into cells with neuron-like morphology, although RA and TSA alone did not have differentiating effects. Immunofluorescent study of neuron-like differentiated cells revealed an enhancement of immunoreactivity to neuron-specific markers including NF-M and τ -1. Therefore TSA induced RA-dependent neuronal differentiation of MSC. Morphological and phenotypical changes can reflect a neurogenic influence of RA on stromal cells.

Key words: mesenchymal stem cells, neuronal differentiation, trichostatin A, retinoic acid.

бутилированный гидроксианизол и др. [2–4]. Картина дифференцировки, морфологически очень похожей на нейрональную, возникает при воздействии этих веществ в течение первых суток. Однако такие клетки не являются жизнеспособными. Изменения клеточной морфологии все чаще связывают с повреждающим воздействием данных веществ и рассматривают их не как дифференцировку, а как артефакт [5–7]. Обработка ММСК естественными факторами роста и индукторами в другой группе исследований [8–11] не ведет к массовой морфологической дифференцировке, а получаемые нейроноподобные клетки имеют целый ряд морфологических и биохимических отличий от нервных клеток или их предшественников. Возможная степень, с которой стромальные

клетки костного мозга могут быть дифференцированы в нервные, до сих пор не определена. К тому же остается неясным, все ли клеточные популяции ММСК способны к нейральной дифференцировке, так как в разных работах используются различные способы селекции и культивирования ММСК, а также приводятся разноречивые данные о доле клеток, способных превращаться в нейроноподобные (от 0,5 до 50%).

Наиболее адекватным подходом, представляющим и теоретический, и практический интерес, является использование в исследованиях нейрональной дифференцировки ММСК естественных индукторов. Одним из таких часто применяемых индукторов является РК — нативный морфоген, играющий особую роль в формировании нервной системы и в нейрональной дифференцировке. Показано, что *in vitro* РК усиливает дифференцировку прогениторных нервных клеток и индуцирует нейрональную дифференцировку эмбриональных стволовых клеток, клеток эмбриональных карцином и нейробластом [12–15]. Обработка РК ММСК взрослого человека не оказывает дифференцировочных влияний даже в условиях сниженного содержания сыворотки. В разработанных ранее протоколах нейрогенные эффекты были получены только при совместном действии РК и набора факторов роста [8, 16]. Имеются данные о том, что действие РК и других ядерных гормонов может модулироваться веществами из группы ингибиторов гистоновых деацетилаз, изменяющими хроматин путем ацетилирования гистонов и таким образом облегчающими доступ активаторных факторов к промоторным участкам генов [17]. На клетках Р19 эмбриональной карциномы было показано, что ТСА, являющийся специфическим ингибитором гистоновых деацетилаз, значительно усиливает нейрогенные эффекты РК путем активации транскрипции от РК-зависимых промоторов [14]. Основываясь на этих данных, мы предположили возможность потенцирования ТСА действия РК на ММСК человека.

Материал и методы

Выделение и культивирование ММСК человека

ММСК получены из 5 мл аспирата костного мозга четырех добровольных доноров. С помощью центрифугирования аспирата в градиенте плотности Histopaque-1077 (Sigma, США) в течение 30 мин при 1000 g выделяли фракцию мононуклеарных клеток. Клеточную суспензию промывали однократно в растворе Хенкса без Ca^{2+} и Mg^{2+} (Gibco, США). Выделенные клетки культивировали в среде DMEM с низким содержанием глюкозы (Биолот, Россия) с добавлением 10% сыворотки крови плодов коровы SC-Biol (Биолот, Россия) и 50 мкг/мл гентамицина сульфата (Gibco, США) в CO_2 -инкубаторе при температуре 37 °C и 5% концентрации CO_2 . Через 48 часов культивирования среду с неприкрепившимися клетками полностью заменяли на свежую. В дальнейшем половину среды меняли каждые 4–5 сут. После образования клеточного монослоя клетки снимали с культуральных чашек путем инкубации с раствором 0,25% трипсина и 1 mM ЭДТА (Gibco, США) при температуре 37 °C в течение 2–3 мин и пересеивали на новые чашки в концентрации 10^5 кл./см².

Индукция направленной дифференцировки ММСК

Индукцию направленной нейральной дифференцировки начинали не ранее пятого пассажа, высевали в 35 мм чашки Петри с покровными стеклами, покрытыми поли-L-лизинном (Sigma, США). Посевная концентрация составляла 5×10^3 кл./см². После 24 ч начинали обработку клеток индукторами согласно трем протоколам.

I протокол: 0,5–10 мкМ РК (Sigma, США) добавляли одновременно с заменой половины среды на свежую каждые 5 сут.

II протокол: 150 нг/мл ТСА (Sigma, США) вводили в среду культивирования однократно через 24 ч после посева клеток, а 10 мкМ РК добавляли, как в первом протоколе, каждые 5 сут.

III протокол: 100 нг/мл ТСА и 10 мкМ РК вводили одновременно с заменой половины среды на свежую каждые 5 сут.

Фазово-контрастная микроскопия

Наблюдения за изменением морфологии клеток проводили с помощью инвертированного светового микроскопа Nikon eclipse TS100, устанавливая фазовый режим. Клеточные культуры фотографировали на встроенную цифровую камеру, соединенную с компьютером. Для регистрации изображений использовали программу Example.

Иммуофлюоресцентный анализ

Клетки на покровных стеклах фиксировали 4% формалином (Sigma, США) в течение 7 мин. После трехкратной промывки PBS клетки пермеабилizировали 0,1% раствором Тритон X-100 в течение 7 мин. Клетки снова отмывали PBS и затем инкубировали 30 мин в растворе 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA) и 2% сыворотки эмбрионов коров (СЭК) для предотвращения неспецифического связывания антител. Затем препараты были инкубированы с первыми антителами в течение ночи при температуре 4 °C. Для иммуноцитохимического выявления нейронспецифических белков были использованы кроличьи поликлональные антитела к нейрофиламенту М (NF-M) (Chemicon, США) и мышинные моноклональные антитела к белку tau-1 (Chemicon, США). Далее препараты инкубировали со вторыми антителами при 37 °C в течение 2 ч. Козьи антикроличьи IgG, конъюгированные с TRITC (Sigma, США), и кроличьи антимышинные IgG, конъюгированные с FITC (Sigma, США), были использованы как вторые антитела. После нескольких промывок PBS препараты заключали в среду Vectashield (Vector Laboratories, США). Клеточные препараты изучали с помощью лазерного конфокального флуоресцентного микроскопа (Leica TCS SL), используя для визуализации метки два отдельных канала.

Результаты

Морфологическая характеристика и пролиферативный потенциал ММСК взрослого человека *in vitro*

ММСК взрослого человека культивировали в течение длительного времени (более трех месяцев). На первых пассажах культура ММСК была представлена, главным образом, вытянутыми фибробластоподобными клетками, формирующими розетки (колонии) (рис. 1а). Через три недели культивирования ММСК приобретали более распластанную форму и обнаруживали выраженную морфологическую гетерогенность. Крупные фибробластоподобные клетки различались по размеру и форме и были представлены вытянутыми веретеновидными, треугольными, прямоугольными и неправильной формы клетками с небольшими отростками (рис. 1б, в). Кроме того, в культуре присутствовали редкие (~0,05%) мелкие клетки с нейрональной морфологией, имеющие компактное клеточное тело и отростки разной длины и степени арборизации. Характерной особенностью поздней (более 3 недель) культуры ММСК служило появление гранул на поверхности крупных клеток, что выглядело как зернистость клеток. При длительном беспассажном культивировании более четырех суток гранулы формировали крупные конгломераты и со временем отрывались от поверхности клеток (рис. 1в).

ММСК обладают слабой пролиферативной активностью. В течение первых трех недель культивирования время удвоения, определяемое путем подсчета клеток при пересевах, составляло около 48 часов. При длительном культивирова-

нии уровень пролиферации постепенно снижался. Нам удалось нарастить из 5 мл аспирата костного мозга 4 млн ММСК за три недели и более 10 млн клеток – за полтора месяца культивирования.

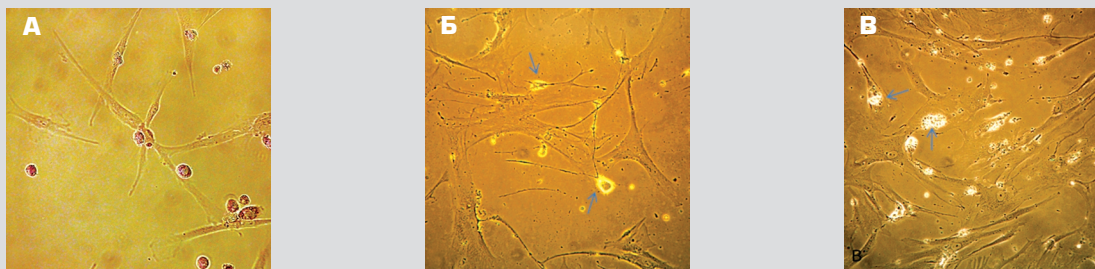


Рис. 1. Первичная культура ММСК взрослого человека:

А – веретеновидные клетки в 10-дневной культуре;

Б – крупные распластанные клетки третьего пассажа, 1 мес. культивирования; стрелками показаны мелкие клетки с нейрональной морфологией;

В – крупные распластанные и удлиненные фибробластоподобные клетки седьмого пассажа, культивирование на поли-L-лизине в течение 10 сут.; стрелками показаны экскретируемые на поверхности клеток гранулы.

Фазовый контраст. $\times 20$

Индукция нейронального фенотипа ММСК *in vitro*

1. Морфологические изменения ММСК

При обработке ММСК РК в концентрациях от 0,5 до 10 мкМ (I протокол) клетки сохраняли свою морфологию, продолжали активно делиться и экскретировать гранулы на своей поверхности. Отличительной особенностью культур, обработанных РК, по сравнению с контрольными культурами было появление через две недели культивирования более сложных форм клеток, подобных нейроглияльным (рис. 2).

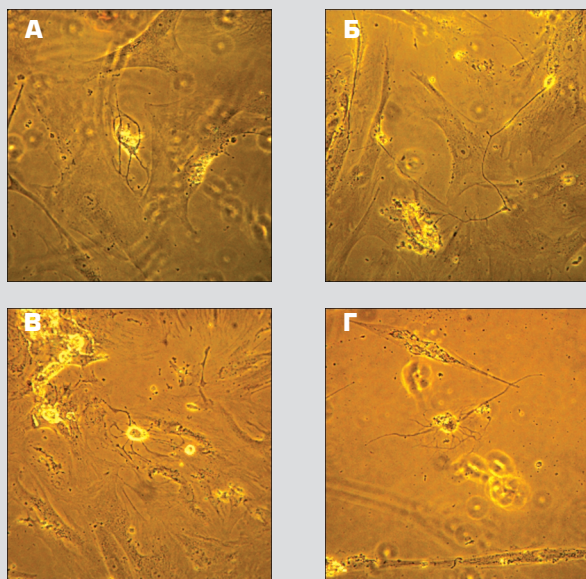


Рис. 2. Клетки с нейрональной и глиальной морфологией в культуре ММСК, подвергнутой обработке 10 мкМ РК в течение двух недель:

А – пирамидоподобная и биполярная (показана стрелкой) клетки;

Б – нервная клетка с длинным отростком; стрелкой обозначено тело клетки;

В, Г – глиеподобные клетки.

Фазовый контраст. $\times 40$

При совместной обработке культуры РК и ТСА (II и III протоколы) клеточная пролиферация блокировалась введением ТСА, а на 12-е сут. индукции начинались процессы выраженных морфологических изменений. Обнаружено, что, с одной стороны, формирование в фибробластоподобных стромальных клетках оптически плотных тяжей и компактизации клеточных тел за счет ретрактивных процессов, а, с другой стороны, истончение и даже распад на фрагменты оптически светлых участков клеточного тела (рис. 3а). В результате около половины клеток приобрели компактную форму с маленькими клеточными телами (перикарионом) и маловетвящимися отростками (рис. 3б). Количество клеток с измененной морфологией постепенно увеличивалось при однократном введении в культуру ТСА (II протокол). Когда ТСА вводили в культуру регулярно (III протокол), доля таких клеток росла прогрессивно.

Некоторые отростки измененных стромальных клеток имели на своих концах расширения, подобные конусам роста (рис. 3в), но мы не обнаружили выраженного роста отростков в культуре. Окончания отростков образовывали концевые (по типу классических нервных) и прилегающие протяженные контакты на телах и отростках соседних клеток (см. рис. 3б, в). Отростки крайне редко пересекали друг друга, и картина межклеточных отношений напоминала реакцию контактного торможения роста отростков, часто наблюдаемую в культурах нервных клеток.

Через три недели обработки ММСК РК и ТСА в культурах появились более зрелые формы нейроноподобных клеток с ветвящимися отростками и/или компактными клеточными телами (рис. 3г, д). Их доля составила около 0,5%.

Помимо морфологических изменений, наблюдаемых при совместном действии РК и ТСА на культуру стромальных клеток, мы обнаружили также исчезновение секреторных гранул на их поверхности. ММСК относятся к фибробластоподобным клеткам, основной функцией которых является обогащение межклеточного пространства матриксными белками. Под действием примененных индукторов происходят не только морфологические превращения, но и изменения в синтезе некоторых белков, по-видимому, относящихся к белкам внеклеточного матрикса. Такие изменения в белковом синтезе могут быть связаны с переориентацией клеточной функции.

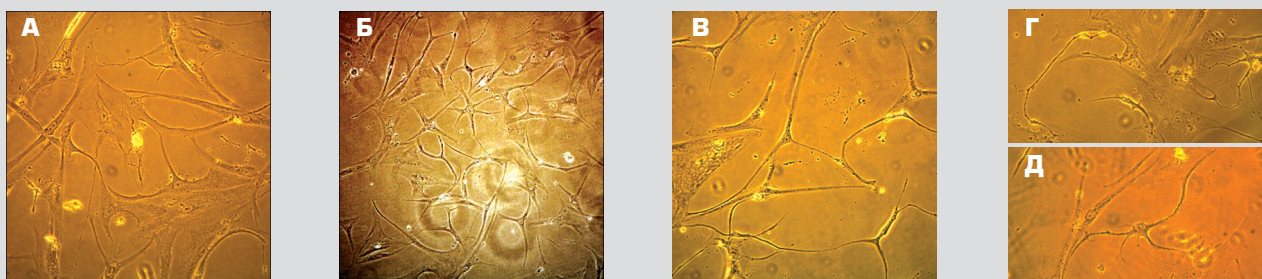


Рис. 3. Морфологические изменения ММСК при комбинированной обработке культур РК и ТСА: А – культура МСК на 12-е сут. индукции; угловой стрелкой показан истончающийся участок тела стромальной клетки; прямая стрелка указывает на мелкую клетку с нейрональной морфологией. $\times 20$; Б – сеть из отростчатых клеток с нейроноподобной морфологией на 14-е сут. индукции. $\times 10$; В – нейроноподобные клетки на 18-е сут. индукции; стрелка указывает на конусовидное расширение отростка. $\times 20$; Г, Д – нейроноподобные клетки на 22-е сут. индукции; стрелками показаны компактные тела мелких клеток. $\times 20$

Наблюдаемые нами изменения морфологии и поведения клеток под воздействием РК и ТСА – компактизация клеточных тел и отростков, визуальное увеличение их оптической плотности, образование межклеточных контактов и сети из отростчатых клеток – напоминают процессы, происходящие в культуре нервных клеток беспозвоночных и позвоночных, поэтому мы провели иммунофлуоресцентное окрашивание клеток на белки, специфичные для нейронов.

2. Иммуноцитохимический анализ экспрессии и локализации нейронспецифических белков

Иммунофлуоресцентное окрашивание было выполнено на клетках, обработанных РК и ТСА в течение трех недель, а также на клетках контрольных культур. Некоторое присутствие специфичных для нервных клеток белков – NF-M и маркера более зрелых нейронов τ -1 – было обнаружено в необработанных клетках контрольных культур (рис. 4а, б). В общей массе обработанных клеток экспрессия исследуемых белков несколько увеличивалась. Причем, если для NF-M было обнаружено усиление интенсивности окраски в

нейроноподобных клетках без изменения внутриклеточной локализации белка (диффузно в цитоплазме) (рис. 4в, д), то для τ -1 характерным было не только накопление в нейроноподобных клетках, но и появление в субмембранном слое многих фибробластоподобных клеток (рис. 4г, е). Заметное усиление окраски обоих белков было видно в длинных отростках и маленьких клеточных телах нейроноподобных клеток. Популяция мелких клеток с морфологией нейронов показывала особо яркое свечение, указывая на повышенный синтез в них данных белков. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание показало, что в таких клетках иммунореактивность к τ -1 встречалась реже, чем к NF-M.

Интересно отметить, что значительное усиление синтеза белков было обнаружено также в некоторых фибробластоподобных клетках (рис. 5). Таким образом, совместное действие РК и ТСА могло усиливать экспрессию нейронспецифических белков, но это не всегда сопровождалось морфологическими превращениями фибробластоподобных клеток в нейроноподобные.

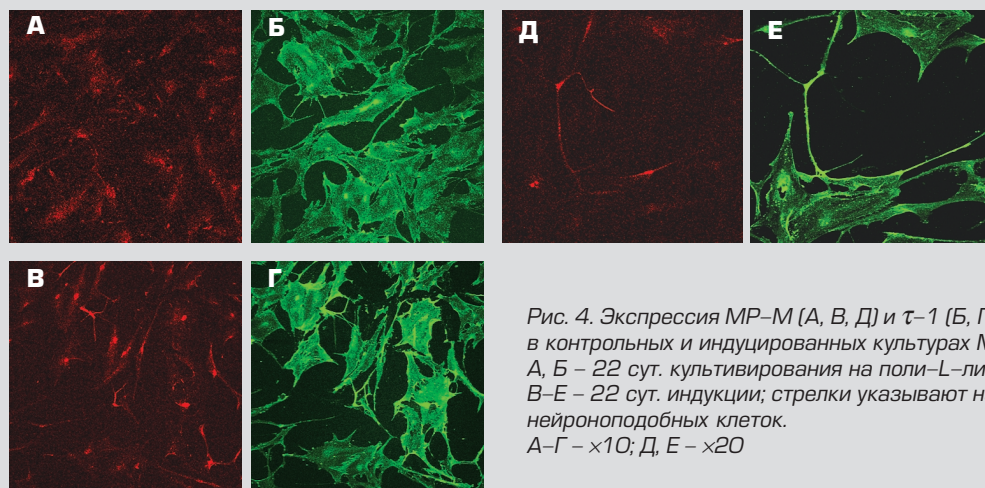


Рис. 4. Экспрессия NF-M (А, В, Д) и τ -1 (Б, Г, Е) в контрольных и индуцированных культурах ММСК: А, Б – 22 сут. культивирования на поли-Л-лизине (контроль); В, Г – 22 сут. индукции; стрелки указывают на тела и отростки нейроноподобных клеток. А-Г – $\times 10$; Д, Е – $\times 20$

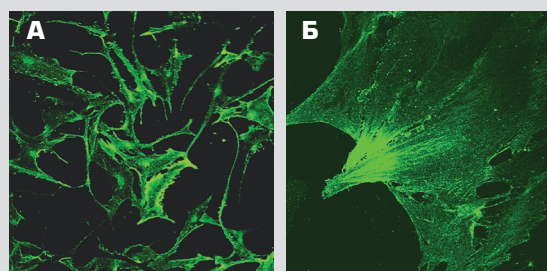


Рис. 5. Повышенная экспрессия и абберантная локализация τ -1 в некоторых фибробластоподобных стромальных клетках, 22-е сут. индукции: А – локализация τ -1 в субмембранном слое стромальной клетки (показано стрелкой). $\times 10$; Б – линейная организация τ -1 в цитоплазме стромальной клетки. $\times 20$

Обсуждение

Наблюдение за ММСК при их длительном культивировании показало морфологическую неоднородность поздней популяции фибробластоподобных стромальных клеток. Если на первых пассажах клетки морфологически мало различаются и имеют вытянутую форму, то через три недели культивирования после достижения высокой плотности клеток в культуре наблюдаются выраженные изменения клеточной морфологии, и, несмотря на повторяемость многих клеточных форм, основная масса крупных стромальных клеток обнаруживает выраженную морфологическую гетерогенность. Можно выделить, как это делается в ряде работ [18, 19], два типа клеток – крупные сильно распластанные и удлинённые фибробластоподобные клетки. Все клеточные формы способны экскретировать на поверхность гранулы, что может свидетельствовать об их фибробластоподобной природе. Кроме того, во всех поздних культурах (после 2–3 пассажа) уже присутствуют редкие мелкие клетки с нейрональной морфологией.

Регулярное введение в культуру ММСК РК (I протокол) не привело к каким-либо значимым нейрогенным эффектам, в отличие от совместной обработки культур РК и ТСА. Морфологический анализ культур, индуцированных РК и ТСА, показал наличие в них двух четко выраженных популяций нейроноподобных клеток. Первая популяция – это более многочисленные (50–70%) крупные отростчатые клетки, образующиеся за счет ретрактивных процессов из больших фибробластоподобных клеток. Их разнообразие происходит, очевидно, из морфологической гетерогенности стромальных клеток. Измененные клетки напоминают нативные нервные клетки *in vitro* по одним морфологическим признакам (наличие длинных отростков, компактное клеточное тело) и отличаются по другим (повышенная адгезия и, как результат, отсутствие отростков кабельного типа и объемного клеточного тела; отсутствие конусов роста, выраженного роста отростков и их арборизации). Обнаруженные изменения в экспрессии нейронспецифических белков NF-M и τ -1, а также прекращение синтеза прежних белков (исчезновение секреторных гранул) свидетельствуют о том, что в таких клетках запускаются процессы нейрональной дифференцировки.

Морфологические и фенотипические превращения стромальных фибробластоподобных клеток при совместном воздействии на них РК и ТСА и по срокам, и по морфологической картине напоминают изменения, наблюдаемые в протоколах с использованием «коктейлей» из ростовых факторов (эпидермального фактора роста, основного фактора роста фибробластов, тромбоцитарного фактора роста и др.) отдельно или в комбинации с РК [8–11, 16]. Однако доля нейроноподобных клеток, получаемых в таких протоколах, невелика. Наилучшие результаты удалось получить при индукции ММСК человека эпидермальным фактором роста, основным фактором роста фибробластов и тромбоцитарным фактором роста, при культивировании клеток на

фибронектине в бессывороточной среде [11]. В этом случае около 90% клеток приобретали морфологию, напоминающую строение нервных клеток, и экспрессировали повышенный уровень нейрональных маркеров. Наш протокол отличается также высоким процентом выхода нейроноподобных клеток (50–70%). При этом мы использовали для индукции ММСК взрослого человека РК без каких-либо ростовых факторов и не снижали содержание сыворотки в индукционной среде. Кроме того, обрабатываемые клетки были культивированы либо на пластике, либо на поли-L-лизине – неспецифическом субстрате, чтобы исключить дифференцировочные влияния подложки. Выраженный дифференцировочный эффект связан, по нашему мнению, с потенцированием ТСА действия РК.

Специфический ингибитор гистоновых деацетилаз ТСА усиливает ацетилирование гистонов во многих клеточных типах, включая клетки костного мозга [20]. Результатом такого ацетилирования в клетках Р19 эмбриональной карциномы является изменение локальной структуры хроматина, способствующее связыванию ядерных ретиноидных рецепторов с активаторным фактором [14]. Полагают, что с этим связано усиление нейрогенных эффектов РК при совместном использовании с ТСА на клетках Р19. Обнаруженный нами дифференцировочный эффект комбинированной обработки ММСК РК и ТСА связан, возможно, с этим механизмом. Представленные в данной работе протоколы с использованием двух индукторов РК и ТСА различались только по степени выраженности запускаемых процессов. При однократном введении ТСА в культуру (II протокол) морфологические и фенотипические изменения стромальных клеток начинались (как и в III протоколе) на 12-е сут. индукции, когда в среде уже не оставалось ТСА. Этот факт, наряду с наличием длительного латентного периода индукции, подтверждает выводы о том, что совместное воздействие ТСА и РК на клетки вызывает запуск дифференцировочных процессов. Наблюдаемые морфологические и фенотипические эффекты могут отражать дифференцировочный потенциал собственной РК. Механизмы длительного латентного периода индукции дифференцировки, наблюдаемого и в других протоколах с применением нативных индукторов, остаются невыясненными.

Необходимо отметить, что ни в одном исследовании с использованием естественных индукторов, так же, как и в данной работе, запущенные процессы дифференцировки не приводили к превращению стромальных клеток в предшественники нейронов или дифференцированные формы. Клетки приобретали ряд морфологических и фенотипических признаков, свойственных нативным нервным клеткам, но абсолютной идентичности достигнуто не было. Кроме некоторых очевидных отличий в морфологии была обнаружена также абберантная внутриклеточная локализация некоторых нейронспецифических белков [10]. В то же время, мы обнаружили случаи повышенного синтеза и изменения внутриклеточной локализации нейрональных маркерных белков в стромальных клетках, не подвергшихся морфологической

трансформации. Очевидно, что переориентация белкового синтеза определяет морфологические превращения, но изменения клеточной формы, как и перестройка внутриклеточной организации, являются, по всей видимости, более длительными процессами.

Вторая популяция нейроноподобных клеток была представлена редкими (не более 0,1%) мелкими клетками, которые имеют больше аналогий с нервными по перечисленным морфологическим признакам. Кроме того, эти клетки обнаруживают значительно более высокую экспрессию нейрон-специфических белков по сравнению с первой популяцией крупных нейроноподобных клеток. В ряде работ по индукции нейрональной дифференцировки ММСК рассматриваются именно такие клетки [9]. Однако они происходят из отдельной малочисленной популяции плюрипотентных стволовых

клеток, присутствующей как в костном мозге, так и в других тканях взрослого организма [21]. Использование этих клеток для целей клеточной терапии сегодня не представляется возможным.

Первая, более многочисленная, популяция стромальных фибробластоподобных клеток, показывающая способность к нейроноподобной дифференцировке, может рассматриваться как возможный источник клеточного материала для заместительной терапии при лечении различных неврологических заболеваний. Если удастся сделать дифференцировочные эффекты стабильными, то возможность направленной индукции фенотипических превращений, особенно таких, как экспрессия нейротрофических факторов или нейротрансмиттеров, расширила бы перспективы использования ММСК как носителей трофических и медиаторных влияний.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Александрова М.А., Сухих Г.Т., Чайлахян Р.К. и др. Сравнительный анализ дифференцировки и поведения нейральных и мезенхимальных стволовых клеток человека *in vitro* и *in vivo*. Клет. технологии в биол. и мед., 2006; 1: 44–52.
2. Woodbury D., Schwarz E.J., Prockop D.J., Black I.B. Adult PKt and human bone marrow stromal cells differentiate into neuron. J. Neurosci. Res. 2000; 61: 364–70.
3. Woodbury D., Reynolds K., Black I.B. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. J. Neurosci. Res. 2002; 69: 908–17.
4. Hung S.Ch., Cheng H., Pan Ch.Y. et al. *In vitro* differentiation of size-sieved stem cells into electrically active neuPKI cells. Stem Cells 2002; 20: 522–9.
5. Lu P., Blesch A., Tuszynski M.H. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, tPKns differentiation, or artifact? J. Neurosci. Res. 2004; 77: 174–91.
6. Neuhuber B., Gallo G., Howard L. et al. Reevaluation of *in vitro* differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of the actin cytoskeleton induces PKpid morphological changes and mimics neuronal phenotype. J. Neurosci. Res. 2004; 77: 192–204.
7. Rismanchi N., Floyd C.L., Berman R.F., Lyeth B.G. Cell death and long-term maintenance of neuron-like state after differentiation of PKt bone marrow stromal cells: a comparison of protocols. BPKin Res. 2003; 991: 46–55.
8. Sanchez-PKmos J., Song S., Cardozo-Pelaez F. et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neuronal cells *in vitro*. Exp. Neurol. 2000; 164: 247–56.
9. Jiang Y., Jahargirdar B.N., Reinhardt R.L. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature 2002; 418: 41–9.
10. Jin K., Mao X.O., Batteur S. et al. Induction of neuronal markers in bone marrow cells: differential effects of growth factors and patterns of intPKcellular

expression. Exp. Neurol. 2003; 184: 78–89.

11. Tao H., PKo R., Ma D.D.F. Cytokine-induced stable neuronal differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in a serum/feeder cell-free condition. Develop. Growth Differ. 2005; 47: 423–33.
12. Riaz S.S., Theofilopoulos S., Jauniaux E. et al. The differentiation potential of human foetal neuronal progenitor cells *in vitro*. BPKin Res. 2004; 153(1): 39–51.
13. Schuldiner M., Eiges R., Eden A. et al. Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells. BPKin Res. 2001; 913(2): 201–5.
14. Minucci S., Horn V., Bhattacharyya N. et al. A histone deacetylase inhibitor potentiates retinoid receptor action in embryonal carcinoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997; 94: 11295–300.
15. Reynolds C.P. Differentiating agents in pediatric malignancies: retinoids in neuroblastoma. Curr. Oncol. Rep. 2000; 2(6): 511–608.
16. Kim B.J., Seo J.H., Bubien J.K., Oh Y.S. Differentiation of adult bone marrow stem cells into neuroprogenitor cells *in vitro*. Neuroreport 2002; 13(9): 1185–8.
17. Garcia-Villalba P., Jimenez-LaPK A.M., Castillo A.I., APKnda A. Histone acetylation influences thyroid hormone and retinoic acid-mediated gene expression. DNA Cell Biol. 1997; 16(4): 421–31.
18. D'ippolito G., Schiller P.C., Ricordi C. et al. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebPKI bone marrow. J. Bone Miner. Res. 1999; 14(7): 1115–22.
19. Simmons P.J., Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. Blood 1991; 78(1): 55–62.
20. Golay J., Cuppini L., Leoni F. The histone deacetylase inhibitor ITF2357 has anti-leukemic activity *in vitro* and *in vivo* and inhibits IL-6 and VEGF production by stromal cells. Leukemia 2007; 21(9): 1892–900.
21. Lakshmipathy U., Verfaillie C. Stem cell plasticity. Blood Rev. 2005; 19(1): 29–38.

Поступила 14.12.2007