

ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ ТА НЕЙРОМЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН

Надійшов 14.06.13

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) були відкриті в 60-х роках ХХ ст. Останнім часом ці клітини привертають до себе велику увагу дослідників завдяки їх перспективності для клінічного застосування. На даний час МСК частіше за все розглядають як мультипотентні клітини з фібробластоподібною морфологією, здатні до проліферації. Це недиференційовані клітини, що мають потенціал до диференціації та формування тканин різних типів, у тому числі кісткової, хрящової та м'язової, а також кістковомозкової строми. У наявних на сьогодні публікаціях є також свідчення про те, що для МСК кісткового мозку є характерними дуже широка пластичність та здатність давати початок гепатоцитам, кардіоміоцитам, епітеліальним клітинам легень, а також певним елементам нервової тканини. У даному огляді представлені результати останніх досліджень фундаментальної біології МСК, виділених із різних джерел, методів їх ідентифікації, потенціалу до диференціації та можливостей терапевтичного використання.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), нейромезенхімальні стовбурові клітини, проліферація, диференціація.

ВСТУП

Використання клітинних технологій зараз є одним із найактуальніших напрямків у біоінженерії. Велика кількість пошкоджень організму людини може бути успішно вилікувана лише із застосуванням досягнень сучасної трансплантології. Однак пересадки органів, їх частин чи певної кількості відповідних клітин пов'язані з низкою серйозних проблем. Серед них – імунна відповідь реципієнта, що обов'язково має бути супресованою; це, в свою чергу, істотно шкодить загальному стану здоров'я пацієнта. Пересадка аутологічного матеріалу з багатьох причин не завжди є можливою. Кількість доступного матеріалу в даному разі звичайно є обмеженою, а відповідні процедури – складними. Використання мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) у регенеративній медицині, очевидно, може бути істотним проривом у трансплантології.

Для успішного застосування МСК у медицині

потрібно створити певні умови культивування таких клітин, які в подальшому або будуть здатними до спрямованої диференціації, або зможуть підтримувати свій стовбуровий потенціал (залежно від конкретних потреб). Для цього необхідно детально ідентифікувати фенотипи субпопуляцій у культурі клітин та підбирати оптимальні умови культивування (кількісний та якісний склад поживного середовища, тип субстрату, газовий склад атмосфери, що оточує клітини, тощо).

ДЖЕРЕЛА ОТРИМАННЯ ТА ВЛАСТИВОСТІ МСК

Кістковий мозок утворений великою кількістю клітин; серед них наявні й стовбурові клітини (СК). СК – недиференційовані клітини, здатні як самовідновлюватися, так і генерувати диференційованих нащадків. СК за проліферативним потенціалом випереджають усі інші проліферуючі клітини і забезпечують оновлення тканин протягом життя. Стовбурові клітини, наявні в

¹Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).
Ел. пошта: oks-ribachuk@yandex.ru (О. А. Рибачук).

кістковому мозку дорослої людини, поділяються на гемопоетичні та стромальні (відповідно 1–2 та 0.05–0.5 % загальної кількості клітин у тканині мозку). Гемопоетичні стовбурові клітини (ГСК) здатні в подальшому забезпечувати довготривале постійне відновлення всієї гемопоетичної системи [1].

У складі клітин строми кісткового мозку (КСКМ; bone marrow stromal cells, BMSC) наявні клітинні одиниці морфологічно й біохімічно різних типів – кістковомозкові фіброластоподібні клітини, адипоцити, остеобласти, макрофаги, ретикулярні та ендотеліальні клітини. КСКМ можуть бути успішно культивовані *in vitro*; серед них є клітини-попередники, здатні утворювати кісткову, хрящову, жирову та інші види сполучної тканини. Проте ці клітини не є гемопоетичними попередниками, які також наявні серед КСКМ та відомі як колонієутворюючі одиниці-фіброласти (colony-forming units-fibroblasts, CFU-f) і МСК (mesenchymal stem cells, MSC). Відомо, що КСКМ та МСК мають багато спільних характеристик, тому дані терміни часто використовуються як синоніми [2].

Під час ембріогенезу МСК вперше з'являються в нервовому гребені, звідки мігрують, створюючи первинний каркас для майбутніх провізорних органів (тривимірний просторовий скелет). Окрім цього, прогеніторні стромальні елементи керують розвитком паренхіми ембріональних органів за рахунок продукції певних чітко визначених комбінацій ростових факторів (TGF α , NGF, HGF, EGF). У постнатальному онтогенезі МСК слугують джерелом клітин сполучної, кісткової, хрящової, жирової та м'язової тканин [3], а також нервових клітин. Частина МСК кісткового мозку є здатними до диференціації в нейрони і глію; такі клітини надалі формують аксони, експресують нейронні та гліальні специфічні маркери (MAP2, NGF, нестін, GFAP) та відповідають на дію певних стимулів як функціонально зрілі нейрони [4, 5]. МСК можуть генерувати фонові сигнали для підтримки життєздатності і проліферації прогеніторних клітин; серед відповідних сигнальних молекул слід згадати LIF, SCF, M-CSF, Flt-3, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15. МСК також здатні формувати сухожилля та строму, яка підтримує гемопоез [6].

Показано, що МСК – це популяція мультипотентних клітин з високою адгезивною здатністю. Їм властиві значна проліферативна активність та збереження свого стовбурового стану. Вони також можуть перетворюватись у хондроцити, остеоцити та адипоцити, спонтанно диференціюючись та да-

ючи початок клітинам інших типів при створенні умов для індукції певного конкретного шляху диференціації [7].

Найбільш розповсюдженими методами одержання МСК є їх виділення з таких органів, як кістковий мозок, вартонів (уортонів) гель, кордова (пуповинна) вена, амніотична рідина, амніотична мембрана, жирова тканина, синовіальна рідина, скелетні м'язи, печінка, пуповинна та інколи навіть периферична кров, плацента [8]. Потрібно відмітити, що субпопуляції МСК зазвичай є істотно гетерогенними за ступенем самовідтворення та потенціалом до диференціації [9, 10].

За допомогою методу проточної цитометрії з використанням великої кількості поверхневих маркерів було продемонстровано, що культивована популяція МСК кісткового мозку є гомогенною більш ніж на 98 %; за певних умов *in vitro* дані клітини легко диференціюються. Кокультивування МСК з ГСК показало, що перші з них (МСК) можуть підтримувати життєздатність або навіть процес поділу ГСК; при цьому МСК формують функціональну строму [11]. У культурі стромальних прогеніторних клітин МСК слугують фідером для виживання всіх клонів гемопоетичних клітин. Окрім цього, МСК можуть синтезувати цитокіни для підтримки життєздатності гемопоетичних одиниць. Унікальний потенціал МСК уже починають використовувати в клініці для відновлення чисельності і функцій клітин у пошкоджених органах [12].

Вивченню МСК приділяють велику увагу в усьому світі, проводячи як фундаментальні, так і клінічні дослідження. Така зацікавленість зумовлена багатьма чинниками, серед яких відносна простота культивування, існування або можливість знаходження специфічних маркерів, наявність імуносупресорної дії при використанні алогенного матеріалу тощо.

Класичним джерелом МСК є кістковий мозок. Отримання клітин з нього, однак, є досить травматичною процедурою, і ця обставина призвела до пошуку альтернативних джерел клітинного матеріалу. Останнім часом МСК активно виділяють із жирової тканини, пуповинної крові та пуповинного канатика [13], м'язової, хрящової тканини та плаценти [14], сполучної [12] та інших тканин. Слід, проте, зауважити, що питання про ідентичність МСК, отриманих із різних джерел, залишається дискусійним [12, 14]. При цьому клітини з кордового (пуповинного) матеріалу мають пере-

ваги перед іншими джерелами МСК. Головними з таких переваг є більш високі проліферативний потенціал та потенціал до диференціації, а також виражені імуносупресорні властивості [15]. Так, клітини строми кісткового мозку змогли культивувати не більше ніж до четвертого пасажу, в той час як клітини кордової крові культивували до дев'ятого-10-го пасажу без виникнення ознак старіння клітин і хромосомних трансформацій. Отримані клітини обох згаданих популяцій характеризувалися фібробластоподібною морфологією, могли реалізувати адипогенний, хондрогенний або остеогенний шляхи диференціації та мали подібний імунотип (CD34-, CD45-, CD44+, CD90+ або CD105+), який не змінювався під час культивування та був описаний для всіх отриманих культур [16]. Було також проведено порівняльний аналіз МСК із кісткового мозку, жирової тканини і пуповинного канатика; при цьому не було виявлено їх відмінностей за морфологією, імунним фенотипом, профілем експресії характерних маркерів, а також за активністю щодо утворення колоній у культурі та здатності до мультилінійної диференціації [12, 14, 17].

Попри все вказане вище, кістковомозкова тканина людини та ссавців залишається найкращим джерелом отримання МСК. Мережа стромальних клітин кісткового мозку заповнює простір між капілярами (синусоїдами) та кісткою. Відносна кількість істинних «сплячих» МСК у кістковому мозку майже однакова з кількістю ГСК. Відомо, що баланс ГСК/МСК відіграє важливу роль у кровотворенні [12].

ІДЕНТИФІКАЦІЯ МСК ТА ПІДТРИМАННЯ ЇХ СТОВБУРОВОГО ПОТЕНЦІАЛУ

МСК є клоногенними клітинами, здатними до спонтанної диференціації в клітини мезодермальної лінії та до індукованої диференціації в клітини деяких типів немезодермальної лінії. Основними критеріями визначення МСК є висока адгезивна здатність до пластикового субстрату при культивуванні, специфічний набір поверхневих антигенів, мультипотентність (плюрипотентність) щодо диференціації. Вищевказані критерії, проте, є досить розмитими (адже, наприклад, даних про чітку антигенну структуру МСК досі не представлено) [8, 18].

МСК несуть велику кількість поверхневих маркерів, проте жоден з останніх на сьогодні не є

абсолютним. Тому для визначення популяцій МСК у мультиклітинних культурах використовують паралельне визначення декількох маркерів [18]. При цьому проводять виявлення як позитивних, так і негативних маркерів. Складність підбору маркерів також зумовлюється високою динамічністю МСК та змінами експресії різноманітних маркерів під час культивування [19, 20].

Існують певні відмінності типів маркерів, що експресуються в МСК, отриманих з різних джерел. Так, МСК, отримані з кордового матеріалу, здатні до експресії рецепторів матриксу CD44, CD105 та інтегринових маркерів CD29 та CD51, але є негативними щодо маркерів гемопоетичної лінії CD34 та CD45. Усі МСК є позитивними за маркерами SH2 і SH3; МСК, отримані з кісткового мозку, є CD13-позитивними [8, 13, 18, 20]. У різних роботах були вказані різні маркери МСК, тому звичайно постає проблема підбору оптимальної комбінації таких маркерів для отримання досить об'єктивної картини [8].

На сьогодні підтверджується адекватність використання CD11b (маркера імунних клітин), CD45 та CD34 (маркерів гемопоетичних клітин), глікофору-А та CD117 (маркерів прогеніторних гемопоетичних клітин) як негативних маркерів МСК людини. За деякими даними, негативними маркерами є також CD14, CD38, CD79, CD19, CD71, CD51/61, CD49d та HLA-DR, що експресуються в МСК лише в присутності IFN- γ [20].

Підбір позитивних маркерів для МСК є надзвичайно складним. У той же час без певного дефінітивного позитивного маркера дослідження таких клітин *in vivo* є недостатньо ефективними та інформативними. Одним із найперших відкритих позитивних маркерів МСК є Stro-1. Клітини, що є Stro-1-негативними, нездатні до формування колоній, а ця властивість є неприпустимою для МСК. Як показано, Stro-1-позитивні клітини можуть перетворюватися на фібробласти, остеоцити, хондроцити, адипоцити та міоцити, що є похідними МСК. У той же час Stro-1 не може бути головним і єдиним МСК-маркером. По-перше, не виявлено „мишачого” аналога цього маркера; по-друге, його експресія проявляється не лише в МСК, а, по-третє, протягом культивування МСК втрачають позитивність за цим маркером; отже, він може використовуватися лише на ранніх етапах культивування. Оскільки власні функції Stro-1 є досі недостатньо відомими, дати остаточну характеристику „стовбуровості” клітин залежно від його експресії

поки що неможливо [19–21].

CD106, або VCAM-1 (молекула васкулярної клітинної адгезії), – це глікопротеїн, що експресується на поверхні ендотеліальних клітин судин; він здатен зв'язуватися з певними інтегринами. Існує припущення, що даний маркер є важливим для визначення МСК, адже він залучений до процесів адгезії, хемотаксису, сигнальної трансдукції. Нестача CD106 під час ембріогенезу призводить до смерті зародка через відсутність хоріон-алантоїсного злиття або до аномального розвитку серця плоду. Показано, що VCAM-1 може бути використаний у поєднанні із Stro-1. Клітини, в яких експресуються обидва ці маркери, характеризуються високою здатністю до утворення колоній та демонструють адекватні ознаки „стовбуровості” – мультипотентність, експресію теломерази та високу проліферативну здатність. У той же час VCAM-1-позитивні клітини мають високий адипогенний потенціал і при сприятливих умовах здатні до прискореного перетворення в жирові клітини [8, 18–22].

CD73 (білок васкулярної адгезії лімфоцитів) є 5'-нуклеозидазою. Хоча він може бути експресований у клітинах багатьох типів, було створено два типи моноклональних антитіл – SH-3 та SH-4, специфічних для визначення МСК. МСК не взаємодіють із гемопоетичними клітинами, остеобластами, остеоцитами; це дозволяє використовувати CD73 для ідентифікації в мультиклітинних культурах МСК, котрі ще не втратили ознаки „стовбуровості” [21, 22].

Дослідження, спрямовані на пошук оптимальних маркерів МСК, дозволили виявити низку потенційних маркерів, котрі на сьогодні ще є недостатньо вивченими. До них належать CD271/NGFR, CD105 (SH-2, ендоглін), CD90/Thy-1, CD29 (ланцюг β 1-інтегрину), CD13 (амінопептидаза N), Flk-1/CD309, SCA-1, CD10, CD44 (рецептор гіалуронату), CD49e, CD54 тощо. У деяких роботах зазначено, що МСК, отримані з пуповини, здатні до експресії певних маркерів плюрипотентності, властивих і ембріональним стовбуровим клітинам (ЕСК), а саме Oct-4, nanog, Sox-2 [22, 23].

Серед внутрішньоклітинних маркерів особливий науковий інтерес викликають BMI-1 та ядерцевий білок нуклеостемін. Експресія генів, що кодують ці білки, є спільною ознакою МСК, отриманих з різних джерел, та слугує адекватним показником стовбурового потенціалу досліджуваних клітин. Визначення зазначених маркерів здійснюється за

допомогою полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (RT-PCR). Нуклеостемін є маркером дедиференційованих клітин, він відсутній у спеціалізованих дорослих клітинах. Цей білок регулює клітинний цикл та може дефектно експресуватись у малігнізованих клітинах [24].

Білки кальпонін, десмін, нестин, NG2-протеоглікан, віментин, α SMA-протеїн, ідентифіковані за використанням методів імуноцитохімії разом з визначенням поверхневих антигенів, також можуть використовуватись як маркери МСК [22–26].

Властивості СК забезпечуються складною сукупністю внутрішньоклітинних процесів. Відомо, що стовбуровий потенціал та самовідновлення МСК підтримуються завдяки наявності факторів росту (LIF, FGF та деяких представників родини Wnt – людських гомологів продукту гена безкрилості дрозофіл) [23].

СПРЯМОВАНА ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ МСК

Як уже згадувалося, МСК здатні до спонтанної диференціації в адипоцити, хондроцити, остеоцити. Існують також дані про можливість їх спонтанної диференціації у фібробласти, теноцити та гладеньком'язові клітини. Під впливом специфічних індукуючих факторів МСК можуть трансдиференціюватись у нейрони та гепатоцити. У 1970 р. Фріденштейн [27] показав здатність МСК до формування колоній; пізніше Піттенгером [28] було виявлено трилінійний потенціал МСК. Результати сучасних досліджень доповнюють ці відомості та показують нові можливості диференціації МСК [23, 25, 29].

У диференційованій дорослій тканині стромальна мережа клітин генерує сигнали для підтримки життєздатності і проліферації прогеніторних клітин [29]. Більшість прогеніторних клітин локалізовані навколо регіональних стовбурових клітин. Переважна частина (80 %) прикріплених до матриксу стромальних клітин у первинній культурі активно проліферують. Фенотип стромальних клітин є досить гетерогенним, що пов'язано з множинністю їх функцій. Практично будь-яка стромальна клітина зберігає здатність до диференціації в клітини жирової, кісткової або хрящової тканини. Ніякої рестрикції мультипотентності серед МСК і прогеніторних популяцій виявити не вдалося. Для доказу мультипотентності стромальних клітин було перерізно більше 200 клонів МСК, ізольованих з однієї

первинної культури. Більше 80 % клонів зберігали *in vitro* остеогенний, хондрогенний і адипогенний потенціал. Пересадки стромальних клітин під капсулу нирки спочатку використовували для доказу мультипотентності цих одиниць [29]. Стромальні клітини зберігають гетерогенний фенотип *in situ*. Множинність фенотипу підтверджує відсутність чинників рестрикції на місці. Багатьма дослідниками була показана перехресна диференціація стромальних адипоцитів в остеобласти, і навпаки. Множинність і пластичність фенотипу таких клітин, очевидно, пов'язані із вкрай низьким розвитком екстраклітинного матриксу строми кісткового мозку.

Незрілі CD34⁻-стромальні клітини виявлені в циркулюючій крові. Таких клітин у кістковому мозку набагато менше, ніж попередників CD34⁺ (одна клітина на мільйон клітин кісткового мозку). В культурі ці клітини прикріплюються до матриксу, формуючи острівці фібробластоподібних клітин. У незрілому стані клітини проліферують протягом декількох пасажів, зберігаючи мультипотентність (здатність до диференціації в лінії адипоцитів, міофібробластів, клітин строми гемопоетичної тканини, хряща і кістки). Обмежена популяція CD34-негативних стромальних клітин із кровотоку повертається в строму кістковомозкової тканини, де трансформується в лінії CD-34⁺-гемопоетичних стовбурових клітин. Ці спостереження дозволили зробити висновок, що рециркуляція прогеніторних мезенхімальних клітин у циркулярному руслі дозволяє підтримувати баланс стовбурових клітин у різних органах через загальний пул клітин [12].

У культурі поодиноких МСК людини (зразки по 10⁶ клітин) спостерігається до 21 циклу подвоєння кількісного складу популяцій, і потомство (принаймні деякі з таких одиниць) дає початок колоніям, що зберігають свою мультипотентність. При аналізі каріотипу 12 пасажів МСК, які зазнали 30 подвоєнь чисельності у популяціях, ніяких хромосомних аберацій не було знайдено. Чи можуть МСК ділитися нескінченно? У даний час є дані про певні ознаки обмеженості розмноження МСК людини. Це виражається в уповільненні темпів проліферації культури та змінах у популяціях багаторазово пересаджених клітин – появі великих „розпластаних” клітин, які, схоже, не діляться (клітинна сенесценція). Питання про можливість знайти умові, які підходять для нескінченного розмноження МСК, залишається відкритим. Однак для цілей дослідження або клінічних цілей не аб-

солютно необхідними, щоб якомога більше мультипотентних МСК було виділено при поточній процедурі. За даними Піттенгера та співавт. [28], із 25 мл аспірованого кісткового мозку в третьому пасажі було отримано більш ніж 10⁹ МСК людини з наступним збільшенням їх кількості.

ВПЛИВ ФАКТОРІВ МІКРООТОЧЕННЯ НА ДИФЕРЕНЦІАЦІЮ МСК *IN VIVO* ТА *IN VITRO*

Цілком очевидно, що СК повинна займати привілейоване становище в межах тканини, а її проліферація повинна перебувати під суворим контролем. Ця контрольна функція здійснюється специфічним мікрооточенням СК – «нішею»; остання вміщує локальні елементи, що підтримують життєздатність і проліферацію згаданої клітини [23].

На вибір тієї або іншої лінії диференціації, а також на подальшу трансформацію СК впливають різні чинники. Одним із таких чинників є організація відповідних генних шляхів. Використання СК у біології дозволило підтвердити існування взаємодії так званих ключових і структурних генів. Від перших із них залежить специфіка розвитку даної тканини або органа. Ключові гени запускають каскад експресії структурних генів, що забезпечують синтез тканиноспецифічних білків і, відповідно, формування зазначеної тканини або органа. Ця закономірність є універсальною і притаманна всім тваринам [30].

Результати численних робіт вказують на те, що широкий спектр фізичних і хімічних факторів мікрооточення *in vivo* визначає пластичність і гетерогенність популяцій прогеніторних клітин у різних тканинних нішах дорослого організму. Моделювання деяких із таких факторів може бути використано для модифікації потенціалу диференціації та неспецифічної субселекції даних клітин з тієї або іншої гетерогенної популяції, одержаної після виділення з різних тканинних джерел. При цьому у більш ранніх попередників може запускатися транскрипційна програма диференціації та старіння. На сьогодні можна з великою впевненістю сказати, що контроль самопідтримки і мультипотентності СК здійснюється в умовах зниженого енергозабезпечення, зокрема в разі низького рівня кисню в середовищі. Це підтримує так звані первинні сигнальні шляхи і транскрипційні

фактори. Подібне обмеження дозволяє СК успішно виживати і відтворюватися, причому потенційна можливість переходів СК у різні функціональні стани – комітацію, диференціацію та спеціалізацію – гальмується. Необхідно зазначити, що таке гальмування розвивається не за принципом «все або нічого» і є оборотним. Це ще раз підтверджує важливість фізіологічних впливів факторів мікрооточення, в тому числі зниженого вмісту кисню, на прогеніторні клітини.

Цікавим в аспекті формування тканинних ніш є взаємодія СК різного генезу і ступеню комітації їх між собою та з диференційованими клітинами мікрооточення. Саме така взаємодія визначає самопідтримку прогеніторних клітин і/або напрямок їх подальшої диференціації. Проте механізми й особливості такої міжклітинної взаємодії в умовах зміненого вмісту кисню залишаються не до кінця зрозумілими. На моделі кокультування алогенних прогеніторних клітин було показано, що в умовах зниженого вмісту кисню МСК *in vitro* активно підтримують гемопоез і підсилюють утворення вогнищ кровотворення з наступною диференціацією гемопоетичних попередників. При цьому збільшується частка стромальних клітин, в яких експресується VCAM-1 і активується синтез інтерлейкінів (IL-6, IL-8). У дослідженнях *in vitro* виявилось, що МСК мають унікальні імуномодулюючі властивості, зумовлені їх неімуногенністю і здатністю до пригнічення проліферації та активації лімфоцитів. При кокультуванні лімфоцитів та МСК відбувалася зміна популяційного складу імунокомпетентних клітин за рахунок зменшення частки ембріональних клітин, збільшення частки CD34⁺-клітин, а також супресії активації Т-клітин. Зниження вмісту кисню додатково пригнічує здатність Т-клітин до презентації антигенів (HLA-DR) [31]. МСК імунологічно інертні, тобто захищені від впливу клітин імунної системи в алогенній ситуації, і можуть забезпечувати толерогенний ефект. У системі *in vitro* МСК перешкоджають дозріванню дендритних клітин, блокують проліферацію Т-лімфоцитів, інгібують хемотаксис і диференціацію В-лімфоцитів та індукують розмноження регуляторних Т-клітин [32]. Аналіз подібних даних вказує на те, що в клітинній взаємодії МСК та імунокомпетентних клітин різних субпопуляцій беруть участь механізми як контактного, так і опосередкованого взаємовпливу. Динамічні зміни рівнів цитокінів, факторів росту і кисню створю-

ють унікальні ніші в умовах такої взаємодії [31].

МЕХАНІЗМИ, ІНДУКЦІЯ ТА РЕАЛІЗАЦІЯ ХОНДРОГЕННОЇ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ МСК

На сьогодні складні молекулярні каскади, що зумовлюють перетворення МСК у хондроцити, залишаються не цілком розкритими. Проте, як відомо, в цьому процесі беруть участь сигнальні молекули, що впливають на експресію певних генів. Останні відповідають за продукцію транскрипційних факторів (*sox-9*, *scleraxis*) та синтез елементів позаклітинного матриксу (колагенів II, IX та XI, агрекану, біглікану, декорину та олігомерного суглобового матричного протеїну). До регуляторів хондрогенезу відносять TGFβ, BMP, GDF, Wnt та деякі інші молекули, щодо яких існують рецептори МСК. Рекомбінантні TGFβ3, TGFβ1, BMP-2, 4, 6, 12 та 13 і GDF-5 здатні індукувати швидке перетворення МСК, отриманих з різних джерел, у клітини хряща. Ліганди TGFβ і BMP діють на клітину, зв'язуючись із рецепторами та запускаючи специфічні внутрішньоклітинні сигнальні каскади за участю Smad та MAPK. У сучасних дослідженнях було виявлено, що ці каскади взаємодіють. Існує думка, що до субстратів MAPK належать гістон-ацетилтрансферази (НАТ), які, у свою чергу взаємодіють зі Smad та посилюють ефекти останнього. Наприклад, субстрат p38 MAPK (MSK) фосфорилує p300-PCAF НАТ, таким чином стимулюючи зв'язування ацетилтрансфераз та формування Smad2/4-НАТ-комплексу. Цей приклад є загальною моделлю синергічної дії TGFβ й BMP на трансактивацію генів-мішеней хондрогенезу [33, 34]. Ліганди Wnt під час хондрогенезу виконують важливу біпотентну модуляторну функцію. Цікаво, що у мишей такі ліганди впливають на BMP-індуковані каскади та посилюють хондрогенез, а у людини хоч і посилюють хондрогенез через різноманітні TGFβ-MAPK-сигнальні шляхи, але одночасно є інгібіторами утворення хрящів. Пригнічення хондрогенезу відбувається за рахунок впливу Wnt на один із найважливіших транскрипційних факторів Twist1. Іншими шляхами є залучення негативної секвестрації хондростимулюючих факторів або пряма репресія генів-мішеней Wnt. Подальші дослідження мають бути спрямовані на вивчення взаємодій вищевказаних сигнальних шляхів та способів регуляції процесу хондрогенезу [26, 29].

Хондрогенну диференціацію в культурі можна ідентифікувати, оцінюючи наявність позаклітинних елементів матриксу. Для цього використовують імуногістохімічні методи, спрямовані на визначення колагенів, глікозаміногліканів та інших маркерних молекул, або забарвлення специфічними барвниками, найчастіше – альціановим синім [33, 34].

МЕХАНІЗМИ, ІНДУКЦІЯ ТА ВИЯВЛЕННЯ ОСТЕОГЕННОЇ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ МСК

Відомо, що BMP-2 та BMP-6 є головними індукторами остеогенезу із МСК. BMP-2 індукує р300-опосередковане ацетилювання *Runx2* – провідного гена кісткової диференціації, і це призводить до підвищення транскрипційної здатності останнього. Таке ацетилювання є специфічним для дії деацетилаз 4 та 5, активація котрих зумовлює деградацію *Runx2* через *Smurf1*, *Smurf2* та E3 убіквітиновими лігазами. Відзначають, що TNF α , пов'язаний з руйнуванням кісткової тканини через запалення, також здатен регулювати рівень експресії *Runx2* через *Smurf1* та *Smurf2*. Важливу модуляторну роль в остеогенезі відіграють і гени *Wnt*. Існують дані про те, що збільшення активації ендогенного *Wnt* є сигналом до посиленого остеогенезу, а зменшення припиняє утворення кістки. Регуляція остеогенезу через *Wnt* у мишей та людей є певною мірою відмінною [35–37].

Остеогенна диференціація в культурі може бути індуквана за рахунок додавання до поживного середовища таких сполук, як дексаметазон, β -гліцерофосфат та аскорбат. Для виявлення ефективності остеогенезу найчастіше використовують моніторинг експресії колагену I, остеокальцину та гістохімічне визначення активності лужної фосфатази. Результати деяких досліджень вказали на раціональність використання CD90/Thy-1 як маркера остеогенної диференціації. Поширеними прийомами оцінки перетворення в кісткову тканину є метод ван Косса, RT-PCR-перевірка експресії BMP-3 та забарвлення алізариним червоним [34, 35].

МЕХАНІЗМИ, ІНДУКЦІЯ ТА ВИЯВЛЕННЯ АДИПОГЕННОЇ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ МСК

Ключовим регулятором адипогенезу є ядерні рецептори гормонів PPAR γ (пероксисомні рецепто-

ри, що активуються проліферацією). Їх активація призводить до різкого посилення адипогенезу та пригнічення остеогенезу. Зв'язування PPAR γ з різноманітними лігандами, серед яких слід згадати довголанцюгові жирні кислоти та тіазолідиндіонові складові, індукує трансактивацію або трансрепресію цих рецепторів. Нещодавно було встановлено, що біпотентний хроматинний корегулятор TAZ є регулятором *Runx2* та корепресором PPAR γ ; зазначені ефекти, відповідно, пригнічують адипогенез та активують остеогенез. Важливим прикладом взаємодії транскрипційних кофакторів адипогенезу є механоіндукція (залежність вибору шляху диференціації від механостимуляції – розтягування). Існують дані про те, що мишачі МСК у випадку механоіндукції здатні давати початок міоцитам, а за відсутності механостимуляції – адипоцитам. Механоіндукція діє, активуючи специфічну групу факторів TIR, що модифікують хроматин за NAT-подібним механізмом. TIR-1 експресується в нормальних умовах та індукує утворення жирових клітин, впливаючи на RhoA-сигнальні шляхи, а TIR-3 стимулює міогенез. Отже, процеси адипогенезу ілюструють зв'язок між змінами цитоскелета та транскрипційною відповіддю [26, 29, 33].

Виявити клітини, що стали на шлях адипогенної диференціації, можна за допомогою специфічних ліпофільних барвників, таких як судани (чорний, III та ін.) й Oil Red. Ще одним важливим критерієм визначення інтенсивності адипогенезу є ступінь експресії PPAR γ [29, 34].

ІНШІ МОЖЛИВІ ШЛЯХИ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ МСК

Результати сучасних досліджень вказують на досить високу вірогідність перетворення МСК у міоцити або теноцити. Після трансфекції, активованої *Notch1*, стромальні МСК перетворюються на м'язові клітини, однак детально механізми цього явища не відомі. Існують роботи, присвячені з'ясуванню можливості перетворення МСК на кардіоміоцити та васкулярні гладеньком'язові клітини. Така диференціація тісно пов'язана з клітинними взаємодіями. Одним із шляхів індукції трансформації в міоцити, як вже зазначалось, є механічне розтягування клітин, що призводить до специфічних перебудов у цитоскелеті. До маркерів процесу диференціації в кардіоміоцити належать GATA-4, MEF2C, TEF1, десмін, α MHC, β MHC та

нестин, а до маркерів перетворення в гладенькі міоцити – ланцюги міозину [26].

Теногенез – формування сухожилля – може відбуватись у культурі в специфічних умовах. Механізм утворення сухожилля пов'язаний з експресією гена *scleraxis*. Нещодавно було показано, що R-Smad8 впливає на регуляцію теногенезу у мишей та гальмує остеогенез [34].

У найновіших роботах висловлюється припущення, що МСК, отримані з кордового матеріалу, можуть диференціюватись у нейрони. Для цього потрібно створити нейральне оточення – наприклад, трансплантувати клітини до мозку щурів [33]. У таких умовах у МСК починають експресуватись маркери нейральної диференціації. Нейрогенез проходить за участю внутрішньоклітинних сигнальних систем MAPK/ERK. Дані деяких робіт свідчать про можливість штучно індукованого перетворення клітин вартонова гелю на гліальні та нервові клітини під впливом FGF та середовища з низьким вмістом сироватки з додаванням гідроксианізолабутилату та диметилсульфоксиду [33, 38].

Ще одним можливим напрямком диференціації МСК вважають їх перетворення на гепатоцити [26].

ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ МСК У НЕЙРОННУ КЛІТИННУ ЛІНІЮ

КСКМ *in vitro* отримують, спираючись на їх адгезивні властивості при обов'язковому сепаруванні і видаленні із суспензії ГСК та їх нащадків. КСКМ, які прилипли до поверхні пластикової підложки, вміщують у спеціальні поживні середовища. Серед речовин, що застосовуються для нейральної диференціації згаданих клітин *in vitro*, використовують ретиноеву кислоту (RA), фактори росту (окремо або в поєднаннях), антиоксиданти, деметилуючі агенти, речовини, що підвищують внутрішньоклітинний вміст цАМФ, а також фізіологічний нейральний індуктор ноггін [12, 30]. Про трансдиференціацію КСКМ у нейроноподібні та гліальні клітини свідчить наявність нейральних маркерів – нестину, віментину, NeuN, β -тубуліну-III, NSE, NF-M, GFAP, Gal-C, NCAM, BDNF і глутамату [39]. У більшості досліджень *in vitro* спостерігалось утворення як нейронів, так і гліальних клітин. Проте в інших дослідженнях із КСКМ утворювались або виключно гліальні клітини, або виключно нейрони без клітин глії. У багатьох експериментах *in*

vitro тваринам трансплантували необроблені або модифіковані клітини кісткового мозку. Зразки кісткового мозку були отримані від мишей, щурів або людей. Для отримання кісткового мозку у мишей деякі дослідники попередньо вводили тваринам 5-фторурацил для посилення утворення СК. Клітини або імплантували безпосередньо в шлуночки головного мозку, або вводили через хвостову вену. Були застосовані різні тваринні моделі (щур з ішемічним інфарктом, миші після опромінення, миші з викликаним дією МРТП паркінсонізмом, миші з компрометованим імунітетом). Зменшення прояву неврологічного дефіциту було зазначено на моделях інсульту, краніоцеребральної травми та хвороби Паркінсона [40].

В експериментальних роботах було показано диференціацію клітин кісткового мозку в клітини мікроглії, астроцити та олігодендроцити. Більшість дослідників вважають, що мікроглія бере початок від гемопоетичної лінії (моноцитів), тоді як астроцити і дендроцити вважаються похідними ембріональної нейроектодерми і в процесі розвитку відрізняються від мікроглії [40]. Однак, на думку деяких авторів, частина мікроглії має нейроектодермальне походження. Енглітіс та Мезі [41] намагалися встановити, як клітини поза межами ЦНС підтримують мікроглію у дорослих мишей. Автори позначили клітини кісткового мозку ретровірусним переносником, що вміщував ген резистентності до неоміцину (*neoR*). Інший підхід до відстеження у реципієнта клітин кістковомозкового походження ґрунтується на гібридизації *in situ* з «датчиком», специфічним для Y-хромосоми клітин кісткового мозку самців-донорів. Деякі клітини кістковомозкового походження були позитивними щодо мікрогліального антигенного маркера F4/80, а в інших проявлялась активація при дії астрогліального маркера GFAP. Приблизно у 10 % клітин кістковомозкового походження в головному мозку виявлявся або мікрогліальний антиген F4/80, або астрогліальний антиген GFAP; фенотип решти 90 % клітин кістковомозкового походження не був встановлений. Як свідчать результати, деякі клітини мікроглії та астроглії виникають із клітин-попередників, котрі зазвичай входять до складу кісткового мозку дорослих особин. Пізніше виявилось, що опромінення не є необхідною умовою для міграції клітин кісткового мозку в головний мозок. Цікавою також є наявність клітин з кістковомозковими маркерами в епендимному шарі мозкових шлуночків. Виявлення клітин

кістковомозкового походження вказує на те, що вони «оселяються» і диференціюються у відповідь на сигнали із субependимальної зони [30].

При кокультивуванні КСКМ трансгених мишей з клітинами середнього мозку плодів мишей (тобто з клітинами, продукуючими фактори мозку, який ще розвивається) виявляли більшу кількість КСКМ із маркерами нейронів (NeuN) та астроглії (GFAP). Результати таких експериментів підтвердили гіпотезу про те, що прямий контакт між клітинами (в додаток до передачі сигналів трофічними факторами і цитокінами) має велике значення при диференціації КСКМ. Окрім ретиноєвої кислоти (фактора диференціації КСКМ у нейроноподібні клітини), використовують диметилсульфоксид, гідроксіамізин-бутилат, гідрокситолуол-бутилат та β -меркаптоетанол у безсироватковому середовищі. Застосовують й інші способи індукції диференціації *in vitro*. Наприклад, це використання 5-азацитину – деметилуючої речовини, здатної змінювати експресію генів у середовищі, що містить у собі суміш факторів росту (фактора росту нервів NGF, мозкового фактора росту нервів BDNF та нейротрофіну 3-NT3). В іншому дослідженні використовували дію нейронного індуктора ноггіна (noggin) – агента, здатного до дифузії, що опосередковує нейронну індукцію на ранніх етапах ембріогенезу, а також нейрогенез у дорослих. Отримані в перебігу даних досліджень клітини утворювали відростки, в них виявлялися специфічні маркери і „нейронні” гени; такі клітини починали реагувати на дію деполаризуючих стимулів як функціонально зрілі нейрони [42].

Інші дослідники повідомили, що введення КСКМ людини в головний мозок гризунів супроводжувалося виживанням та міграцією ін'єкованих клітин. Клітини кісткового мозку людини, виділені за їх адгезивною здатністю та введені безпосередньо в смугасте тіло головного мозку шурів, вміщували бісбензамід. Через п'ять–72 дні зрізи головного мозку досліджували на наявність донорських клітин. Приблизно 20 % донорських клітин успішно приживалися в головному мозку реципієнтів. Клітини мігрували від місця введення в мозолисте тіло та кору, в тому числі в її скроневу частку. Після приживання ці клітини втрачали маркери, типові для клітин строми кісткового мозку в культурі (такі, як імунореактивність щодо антитіл проти колагену і фібронектину). КСКМ набували багато характеристик астроцитів, і їх приживання та міграція значно відрізняли їх від фіброblastів, які після

приживання продовжували виробляти колаген [40].

Трансплантація КСКМ новонародженим мишам у бічний шлуночок мозку призводила до міграції таких клітин через передній мозок і мозочок, причому без порушення цитоархітекtonіки головного мозку хазяїна. У цих експериментах клітини строми кісткового мозку сепарували від клітин, в яких виявляли поверхневий клітинний рецептор CD11b (маркер мієлопоетичних клітин). Пересажені КСКМ були мічені бромодезоксиуридином (BrdU) для відстеження подальшої долі таких одиниць. У передньому мозку багато клітин донора були виявлені на боці ін'єкції в усьому смугастому тілі. Повідомлялося також, що ці КСКМ мігрують вздовж провідних шляхів білої речовини, в тому числі в мозолисте тіло. Було показано, що багато трансплантованих КСКМ вистилають епендиму шлуночків. Наявність клітин із подвійними мітками (і BrdU, і GFAP) свідчило про те, що деякі КСКМ у смугастому тілі, молекулярному шарі гіпокампа і мозочку диференціювалися в астроцити. Цікаво, що КСКМ розташовувалися також у зонах, в яких відбувається активний постнатальний нейрогенез, зокрема в острівцях Каллеха (у вентральній частині переднього мозку) і в субependимальному шарі нюхової цибулини. Значну кількість клітин, мічених BrdU, виявляли інтегрованими в листках мозочка; більшість таких клітин локалізувались у шарах кори великих півкуль. Клітини Пуркін'є в мозочку не були мічені BrdU; цей факт пов'язаний з більш раннім дозріванням даних одиниць у перебігу ембріогенезу. Багато КСКМ, мічених BrdU, рівномірно вистилали четвертий шлуночок, і їх невеликі осередки виявлялися в провідних шляхах білої речовини, які прилягають до задніх рогів четвертого шлуночка. Згідно з висловленим припущенням, КСКМ мігрували до зовнішнього зернистого шару мозочка і ретикулярної формації стовбура мозку, рухаючись тими ж самими шляхами, які використовуються нервовими попередниками при міграції з ромбічної губи в початковий зовнішній зернистий шар під час ембріогенезу. У рідких випадках КСКМ, позитивні щодо нейрофіламентів, виявлялися в стовбурі мозку. Це свідчить про те, що деякі КСКМ диференціюються в клітини з нейральним фенотипом [43].

Накано та співавт. [44] показали, що клітини кісткового мозку після безпосереднього введення в смугасте тіло неопроміненим мишам здатні диференціюватися за трьома різними гліальними фенотипами (в олігодендроцити, астроцити та мікроглію). Однак системне введення клітин

кісткового мозку призводило до появи в головному мозку лише мікроглії кістковомозкового походження. Цей факт вказував на важливість мозкового мікрооточення в наданні наказових сигналів для астрогліальної та олігодендрогліальної диференціації. Клітини кісткового мозку відстежувалися за допомогою попередньої мітки ретровірусним носієм, що вмщував ген білка зеленої флуоресценції (green fluorescence protein, GFP). До внесення мітки клітини кісткового мозку піддавалися попередній стимуляції людським інтерлейкіном-6 (IL-6) протягом 48 год у покритих фібронектином культуральних чашках. Опроміненим мишам кісткомозкові клітини трансплантували за допомогою або системної інфузії, або безпосереднього введення в смугасте тіло головного мозку. Для ідентифікації типів клітин зрізи мозку мітили специфічними антитілами щодо маркерів нейральних клітин – нейронспецифічної енолази для нейронів, GFAP для астроцитів, карбоангідрази-С для олігодендроцитів та Iba-1 для мікроглії. Через 24 тижні після системної інфузії трансплантовані клітини були Iba-1-позитивними, але жодна з них не мала маркерів інших мозкових клітин. Ці результати суперечать даним, отриманим іншими авторами [45]; у мозку мишей після системного введення клітин кісткового мозку були виявлені як клітини мікроглії, так і астроцити. Слід зауважити, що у двох цитованих дослідженнях популяції клітин кісткового мозку розрізнялися.

Згодом було показано, що КСКМ мають білки, типові для різних стадій розвитку нервових клітин, але не було ясно, чи спостерігається у даних клітин функціональна активність, характерна для справжніх нейронів. До цього часу лише одна лабораторія опублікувала переконливі свідчення наявності функціональної “нейронної” активності КСКМ *in vitro*. Нейрони кістковомозкового походження були ідентифіковані згідно з результатами відведення за допомогою поверхневого електрода від непошкоджених клітин [5]. Вплив 5-азацитидину на КСКМ призводив до збільшення потенціалу спокою мембрани від -20 мВ на 14-й день до -50 мВ на 28-й день. Аналогічний потенціал спокою мембрани відзначався у нейронів, які слугували позитивним контролем. Були виміряні також іонні струми з використанням методу voltage-clamp. При відповідних значеннях потенціалу чітко виявлявся струм, що за властивостями був подібним до потенціалзалежного калієвого струму. Калієві канали починали демонструвати активність одночасно з морфологічними змінами та підвищенням експресії нейронспе-

цифічних маркерів. Більш того, була зареєстрована здатність нейронів, що походили з клітин кісткового мозку, відповідати на прикладання деполяризуючих стимулів. Ці клітини демонстрували швидке та зворотне підвищення вмісту кальцію у відповідь на дію ацетилхоліну, що властиво саме нейронам [5].

Ще однією з цікавих властивостей клітин строми кісткового мозку є їх схильність до міграції. Як показали результати досліджень, трансплантовані клітини кісткового мозку дорослих особин можуть мігрувати із системного кровотоку в головний мозок, де вони піддаються трансдиференціації в нейрони, клітини мікроглії та астроглії; в них з'являються специфічні антигени для цих клітин (маркер нейронів NeuN, нейронспецифічна енолаза NSE, маркер астроцитів GFAP, маркер мікроглії Iba 1) [40].

Як виявила інша група науковців в аналогічному дослідженні, клітини кісткового мозку, введені опроміненим мишам, мігрували в головний мозок та диференціювалися в клітини, що проявляли властивості нейронів [30]. Від дорослих трансгенних мишей отримували кістковий мозок; клітини були мічені GFP. GFP-позитивні клітини кісткового мозку вводили через хвостову вену (у кількості $6 \cdot 10^6$ клітин) ізогенним мишам, які були піддані опроміненню в летальній дозі. Головний мозок досліджували через кілька місяців після трансплантації. За допомогою світлової флуоресцентної мікроскопії була виявлена присутність GFP-позитивних клітин у різних відділах головного мозку, зокрема в нюховій цибулині, гіпокампі, корі і мозочку. Згідно з результатами дослідження окремих клітин головного і кісткового мозку реципієнтів, усі GFP-позитивні клітини, які прижилися в кістковому мозку, були CD45-позитивними (CD45 є поверхневим маркером усіх ліній зрілих клітин крові, що вмщують ядро). Однак у головному мозку тільки у 20 % GFP-позитивних клітин були відсутні як CD45, так і CD11b (останній є поверхневим маркером, що проявляється в усіх мієломоноцитарних клітинах). Ці дані засвідчили, що під впливом мікрооточення головного мозку субпопуляція клітин кісткового мозку набула нових фенотипів. З використанням конфокальної мікроскопії дослідники встановили, що окремі GFP-позитивні клітини також мали антигени, властиві нейронам. Для детального кількісного вивчення була обрана нюхова цибулина; було виявлено, що через вісім–12 тижнів після трансплантації 0.2–0.3 % загальної кількості клітин кістковомозкового походження відповідали за своїми властивостями нейронам. Значна частина

інших клітин такого походження синтезували продукти численних генів, також властивих нейронам [30].

НЕРВОВИЙ ГРЕБІНЬ ТА ЙОГО СТОВБУРОВИЙ ПОТЕНЦІАЛ

Нервовий гребінь (НГ) являє собою сукупність клітин, які в процесі ембріогенезу відділяються з дорсальних частин нервового жолобка під час його замикання в нервову трубку. Після того як клітини НГ (КНГ) переміщуються з нейроепітелію нервової трубки, вони починають активно мігрувати в організмі зародка та дають початок різноманітним зрілим тканинам. Особливостями НГ, які завжди цікавили дослідників ембріонального розвитку, є активна, цілеспрямована і тривала міграція клітин та значна різноманітність зрілих структур, утворених із КНГ. До похідних НГ відносять сполучну тканину – компоненти дерми та жирової тканини обличчя та вентральної частини шиї, м'яку та павутинну оболонку головного мозку, сполучну тканину рогівки, сполучну тканину слинних, слюзових, щитовидної та парашитовидної залоз, тимуса, компоненти сполучної тканини серця та кровоносних судин. Іншими похідними є скелетні тканини (кістки та хрящі голови), м'язові тканини (ціліарні м'язи очей, гладенькі м'язи стінки кровоносних судин, деякі поперечносмугасті м'язи голови), клітини ендокринних залоз (мозкова речовина наднирників, кальцитонінпродукуючі клітини щитовидної залози, клітини каротидних тілець), пігментні клітини (меланоцити), нервові клітини (аферентні нейрони спинного мозку та черепно-мозкових ядер, аферентні нейрони спірального та вестибулярного гангліїв, клітини вегетативних гангліїв внутрішніх органів) та нейрогліальні клітини (шванівські клітини периферичних нервів, нейросателіти чутливих та вегетативних гангліїв).

Таким чином, НГ є хорошим об'єктом для аналізу основних закономірностей ембріонального розвитку як периферичної нервової системи (ПНС), так і багатьох інших тканин. Проте здатність клітин гангліозної пластинки (це ще одна назва НГ) до проліферації в процесі ембріогенезу зменшується і після народження втрачається зовсім [46].

Клітини майбутнього НГ мігрують з нервових складок – кінців відкритої нервової трубки, що росте. Коінкубація експлантатів нервової пластинки та епідермісу є достатньою для утворення КНГ в обох

ділянках тканини [47]. Момент появи КНГ визначають відповідно до наявності мРНК двох маркерних генів (*Slug* та *Snail*), а пізніше – *Pax-3*. Точну комбінацію сигналів, що запускає появу КНГ як *in situ*, так *in vitro*, поки що не встановлено. Поява глікопротеїну Noelin1 на поверхні клітин свідчить про появу перших клонів НГ у нервовій трубці. В нервовій трубці зародків ссавців ретровірусна над-експресія Noelin1 призводить до тривалого утворення та міграції КНГ [48, 49]. Встановлено, що із ЕСК, нейральних стовбурових клітин (НСК) або клітин первинної ектодерми отримати КНГ лабораторним способом неможливо. Фетальна тканина мозку, мабуть, завжди буде джерелом для виділення унікальних провізорних ліній різних органів, зокрема єдиним джерелом КНГ. Наприклад, аорта зародків слугує унікальним банком ангиобластів, які неможливо виділити з інших тканин.

У головному відділі з КНГ утворюються ганглії черепномозкових нервів, слуховий, вестибулярний та ціліарний ганглії. Значна частина КНГ диференціюється в астроцити, мікроглію та олігодендроцити. Подібно клітинам строми ці клітини в подальшому виробляють фактори росту bFGF, EGF, TGF- α , NGF, PDGF, HGF, ILGF-1, NGF, NT3 та GGF, характерні для СК та прогеніторних клітин [50]. Одночасно КНГ відіграють роль “провізорної мезенхіми”, яка підтримує розвиток середнього та заднього мозку. Локальне видалення переважної частини КНГ призводить до максимального апоптозу нейроепітелію та розвитку аномалій прозомерів [51]. Основна частина КНГ слугує джерелом СК для утворення клітин гладеньких м'язів, а також серицитів усєї артеріальної та венозної системи обличчя та шиї [52].

УТВОРЕННЯ, РОЗВИТОК ТА МІГРАЦІЯ КНГ

НГ є мультикомпонентною структурою, що містить у собі низку клітинних популяцій. КНГ виникають у ембріонів хребетних на стадії нейруляції на межі нервової пластинки, між майбутнім нейронним епітелієм та епідермісом. Формування НГ значною мірою залежить від набору сигнальних молекул та транскрипційних факторів, дія яких напроцуд точно координується в часі та просторі на стадіях гастрюляції та нейруляції. Сучасні літературні джерела підтверджують наявність у регулюючому ланцюзі гена, який бере участь в індукції та

формуванні НГ [53, 54].

На початку формування НГ активуються сигнальні шляхи BMP, Wnt та FGF у зоні утворення ненейронної ектодерми та параксіальної мезодерми [55]. Експресія відповідних генів активує інший набір генів транскрипційних факторів, які в свою чергу контролюють процеси клітинної проліферації, міграції та диференціації [54, 56].

КНГ виникають у результаті епітеліомезенхімальної трансформації. Ця трансформація супроводжується експресією *Hox*-генів (*Slug*, *gooseoid*, *Dlx2*, *Dlx3*, *Barx1*, *dHAND*, *eHAND*). Також відомо, що на поверхні стовбурових/прогеніторних КНГ існують рецептори для ендотеліну-1 [57]. Ген *Slug* залишається найбільш універсальним маркером епітеліомезенхімальної трансформації клітин, оскільки антисенсолігонуклеотиди мРНК *Slug* блокують її найбільш ефективно [15]. Експресія гена *Pax-3* перетворює клітини-попередники НГ у тимчасову лінію на період їх розселення по організму. Трансфекція та надекспресія гена *Pax-3* призводять до утворення імуорталізованих фібробластів, які перетворюються в пухлини мишей лінії *pude*. Безпосередньою мішенню дії продукту гена *Pax-3* є ген *Msx-2*, котрий контролює плюрипотентність проліферуючих незрілих прогеніторних КНГ [58]. Експресія *Pax-3* в прогеніторних клітинах одночасно вмикає активність іншого гена (*Foxd3*). Сприяючи експресії транскриптази HNK-1 і кадгерину-7, продукт гена *Foxd3* посилює міграцію ранніх прогеніторних клітин із НГ [59]. Популяція мігруючих попередників периферичної глії маркуються антитілами до транзитину [60]. Популяція прогеніторних КНГ, що мігрують у серце, маркуються рецептором щодо PDGF. Ретиноева кислота в тератогенних дозах викликає пригнічення експресії “навігаційних” рецепторів та запускає аномалії міграції КНГ *in situ* [61].

Для епітеліомезенхімальної трансформації є характерною зміна спектра поверхневих молекул адгезії. Якщо в центрі клона проміграційні клітини щільно зчеплені з молекулами N-кадгерину, то мігруюча популяція прогеніторних КНГ продукують кадгерин-6 та кадгерин-11 [62]. Під час епітеліомезенхімальної трансформації в клітинах головної частини НГ активується ген *Hox-7*. Характерно, що у частини клітин хоріоїдного судинного пучка, мігруючих у головний мозок та вбудованих у шар епендими, відбувається активація гена, близького до *Hox-7* [63].

Незабаром після формування та замикання

нервової трубки КНГ мігрують вздовж декількох стереотипних маршрутів в ембріональній тканині та, кінець кінцем, осідають та диференціюються в різних обраних місцях [64, 65]. Клітини головного відділу НГ мігрують дорсо-вентрально, формуючи кістковом’язовий і хрящовий каркас та сполучну тканину лицьового черепа та шиї (включаючи хрящі гортані, вуха, внутрішнього вуха, строму тимуса, нейроепітелій щитовидної залози, зачатки зубів). Мігруючі клітини із вентрального та дорсолатерального відділів зародка локалізуються в місці майбутнього розташування гангліїв, наднирників, структур ПНС. Адгезивні глікопротеїни (фібронектин, колаген та ламінін) сприяють міграції КНГ. Антитіла до вищевказаних глікопротеїнів, як і антитіла до молекул адгезії, частково інгібують рух клітин *in situ*. Інвазивні властивості КНГ є вельми вражаючими, оскільки вони у ссавців практично заповнюють усі тканини та генерують клітини дуже різноманітних типів. З пулу КНГ виникають значна кількість пігментних клітин (меланоцитів), які наявні в шкірі ссавців та внутрішнього вуха; виключеннями є пігментні клітини сітківки. КНГ формують ПНС, тобто нейрони сенсорних, симпатичних, парасимпатичних гангліїв, а також шванівські клітини [66]. КНГ також оточують клітини нюхового нерва [67]. Крім того, з КНГ походять клітини деяких нейроендокринних типів [68].

Пересадка плюрипотентних клітин проамніону (здійснена поза ембріональною ектодермою, між ектодермою та нервовою трубкою зародка) також призводить до появи КНГ із клітин трансплантата. Це свідчить про вирішальну роль сигналів мікрооточення в первинному виникненні КНГ. Виявлено критичний період, коли концентрація сигналів, сприяючих утворенню КНГ, досягає максимуму [69]. Локальні ін’єкції протеїну SHH блокують появу ендотелін- та *Slug*-позитивних прогеніторних клітин. *Noggin*, *BMP-4*, *BMP-7* не впливають на появу КНГ. Як і у випадку нервової трубки, поява перших клонів стовбурових КНГ (СКНГ) пов’язана з активацією одного із *Sox*-генів (*Sox-10*). Гени цієї родини відповідають за плюрипотентність стовбурових клітин [70]. Проміграторні прогеніторні клітини клонів НГ також зберігають плюрипотентність. Підтвердженням слугує той факт, що клони плюрипотентних КНГ вдалося виділити як з периферичних нейронів симпатичної та парасимпатичної нервової системи, так і з периферичних гангліїв. Мігруючи на десятки

сантиметрів на периферію, частина прогеніторних клітин зберігають мультипотентність. Проте більшість поодиноких мігруючих клітин, які покидають клон, зберігають більш обмежену здатність до диференціації.

Клоногенна культура КНГ є мультипотентною. Із загального пулу незрілих клітин вдалось отримати нейрони, гліоцити, шванівські клітини, гладеньком'язові клітини, хондроцити, остеобласти, міобласти. У той же час із клоногенної культури НСК отримати КНГ не вдається. Невідомо, чи залишаються якісь резерви незрілих КНГ у мозку дорослих тварин та людини. Клоні НГ *in situ* зберігають мультипотентність, оскільки “ядро” клона являє собою ізольовані шари щільно зібраних прогеніторних клітин. Мультипотентність клонів НГ у культурі є нижчою, ніж при їх трансплантації.

Під час ембріогенезу нейроепітеліальна вистилка спинного мозку щура зберігає клони провізорних клітин, з яких виникають як клони НГ, так і суспензійні клони НСК. Тому прийнято думати, що частина загальних некомпітованих попередників зберігаються в спинному мозку ще зі стадії нервової трубки. В культурі лише ВМР-2 та ВМР-4 стимулюють утворення клонів НГ зі спинального нейроепітелію зародків щура [52]. Не виключено, що високий вміст ВМР-2 та ВМР-4, отриманих з аорти, впливає на автономний нейрогенез ланцюга симпатичних гангліїв з мігруючих КНГ. Автономний нейрогенез гангліїв із внесених прогеніторних популяцій НГ спостерігається в серці, легенях, де локальна концентрація ВМР є високою, як і в аорті.

У клонах КНГ експресують N-кадгерин та кадгерин-6. Мігруючі прогеніторні клітини, що покидають клон, є позитивними щодо кадгерину-7 та кадгерину-11. Мігруючі КНГ відрізняються за експресією сигнальних G-білків нового класу – Rho-ГТФаз. Зміна молекул адгезії на поверхні КНГ відбувається за допомогою експресії двох *Hox*-генів – *Msx1* та *Msx2* [71]. Регіональне вмикання активності *Msx-1* та *Msx-2* опосередковує багато функцій, у тому числі й закладку зубних зачатків та відростків верхнього ясна. Ці гени експресуються також у міжфаланговій тканині кінцівок, яка гине за апоптотичним сценарієм. В епідермісі шкіри та волосяних фолікулах гени *Msx1/Msx2* контролюють чисельність клітин у тканині.

Клоногенний ріст СКНГ пов'язаний з трьома феноменами – самовідтворенням клітин, рестрикцією диференціації прогеніторних клітин та апоптозом; останній виступає селектором виживання частини

прогеніторних клітин.

Якщо на рівні відновлення та рестрикційної диференціації переважає “інструкційний” механізм, апоптоз використовується як селектор для відбору клітин. Без апоптозу регулювання самовідновлення прогеніторних клітин у клоні є неможливим. Максимальну швидкість проліферації мають клони, де сусідні шари прогеніторних клітин утримуються завдяки взаємодіям *Notch/Delta* [72]. Три ізоформи гена (*Notch1*, *Notch2* та *Notch3*) забезпечують унікальну комбінацію рецепторів на поверхні як прогеніторних клітин нервової трубки, НГ і сомітів, так і інших клітинних похідних екто-мезодерми [73]. Серійний аналіз генної експресії в клонах НГ показав, що максимально експресується мРНК *Notch/Delta*. Як і у випадку НСК-клонів нейроектодермального походження, *Notch-Delta*-контакти відігравали роль основного “вето”, що забезпечувало зупинку проліферації в прогеніторних шарах. Велика щільність прогеніторних клітин через наявність *Notch-Delta* захищає клони від випадкового нейрогенезу. Такий агент, як неурегулін, стимулював проліферацію прогеніторних клітин у нейросферах [74]. Механічна дисоціація сфер КНГ призводить до втрати плюрипотентності прогеніторними клітинами [75]. Особливістю клонів НГ є те, що стимуляція взаємодії *Notch/Delta*, блокуючи нейрогенез, активує дозрівання шванівських клітин у периферичних гангліях [76].

Як згадана різноманітність клітинних ліній НГ може одночасно існувати в ембріоні, що розвивається? В цьому аспекті найбільш докладно обговорювалися дві точки зору: 1) згідно з початковою моделлю детермінації клітинних ліній, КНГ диференціюються з клітин-попередників різного генезу при комітуванні в період розвитку НГ; 2) згідно з альтернативною точкою зору, всі похідні КНГ виникають з одного виду мультипотентних СК (так само, як уся різноманітність клітин крові під час гемопоезу виникає з ГСК). З'ясування механізму виникнення різних за фенотипом клітин з НГ потребує подальшого детального аналізу.

МОЖЛИВІ ШЛЯХИ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ СКНГ

З огляду на те, що КНГ можуть давати початок сполучній, м'язовій та нервовій тканинам, а також утворювати ендокринні та пігментні клітини, було б доцільно розглянути відповідні дані літератури

докладніше.

З використанням методу кінцевих розведень було доведено, що серед дисоційованих прогеніторних КНГ є клоніндукуючі клітини. Проте фенотипові проміграторні прогеніторні клітини мають різний генетичний потенціал. Фенотипова гетерогенність прогеніторних одиниць у межах клонів поєднується з високою пластичністю клітин, яка проявляється при трансплантації останніх.

Нейрогенез зі СКНГ опосередковується тим самим ланцюгом генів, що й нейрогенез із НСК нервової трубки; коекспресія *Wnt-1/Wnt-3* необхідна для експансії прогеніторних популяцій. У низці випадків у ланцюг включається *Mash1* (для деяких спеціалізованих ліній разом з нейрогенінами *Ngn1* та *Ngn2*) [77]. Комбінації факторів TGF- β , BMP-2, BMP-4, bFGF та EGF індукують диференціацію прогеніторних КНГ у сенсорні нейрони, нейрони вегетативних гангліїв, гладеньком'язові клітини, клітини провідної системи серця.

СК ростральної частини НГ дають початок гладеньким міоцитам судин голови. Було показано, що TGF- β потенціює розвиток нащадків СКНГ за коректним типом. Більш того, під дією TGF- β із СКНГ утворюються клітини, які здатні до ацетилхолінзалежного скорочення. Молекулярні механізми проміогенного впливу TGF- β включають у себе активацію факторів транскрипції SMAD2 та SMAD3 [78]. Інші дослідники встановили, що TGF- β 1-залежна диференціація СКНГ у гладенькі міоцити здійснюється завдяки активації кальцій-нейринового каскаду сигнальної трансдукції [79].

Маючи міогенний потенціал, СКНГ можуть трансдиференціюватися в ендотеліоцити та здатні формувати капілярну мережу [80]. У той же час було встановлено, що НСК дорослого та ембріонального мозку під впливом таких факторів росту, як BMP6, BMP7, GDF5 та GDF6, ініціюють ріст прогеніторів НГ. Аналіз відповідних клонів показав, що СКНГ у присутності BMP7 диференціюються в гладенькі міоцити та гліоцити периферичних відділів нервової системи. При цьому відбувається активація експресії маркерів, характерних для похідних НГ (p75, AP-2 α , а також факторів транскрипції *Msx-1* та *Msx-2*) [81].

Клони КНГ, ізольовані з ростральних відділів даного гребеня, можуть також диференціюватися в меланоцити. У випадку диференціації прогеніторних клітин НГ у меланоцити у клітин формується складний комплекс рецепторів для тривалої навігації. По-перше, продукуються рецептори c-kit для SCF.

Мігруючі попередники меланоцитів виробляють SCF, який збирає різні клітини в пластинку. Частина клітин одночасно вміщує рецептори двох нових типів – c-kit (рецептор тирозинової кінази) та рецептор ендотеліну-3 [82]. Синхронно активуються експресія *Wnt1* та *Wnt3a*, а також продукція транскриптази MITF, необхідні для вмикання активності ланцюга генів синтезу меланіну [83]. Трансгенні миші з надлишковою кількістю гена *Wnt-1* мають гіперпігментовану шкіру за рахунок збільшення кількості меланоцитів.

Відомо, що активація транскриптази HAND1 у прогеніторних КНГ призводить до міграції останніх у провідну систему міокарда та впливає на їх подальшу диференціацію в кардіоміоцити [84].

Вважають, що стовбурові клітини дермального походження, розташовані у волосяних фолікулах людини, є похідними СКНГ та зберігають свій прогеніторний потенціал протягом усього життя [85]. Такі клітини в культурі дають початок нейронам, гладеньким міоцитам, шванівським клітинам, хондроцитам та меланоцитам; вони також здатні до самовідтворення [86].

У перебігу ембріогенезу перші попередники олігодендроцитів у спинному мозку із СКНГ з'являються у зародків людини на 45-й день розвитку [87]. У попередниках олігодендроцитів експресуються рецептори щодо PDGF. Утворення попередників олігодендроцитів як *in vitro*, так і *in vivo* запускається SHH. На першому етапі прогеніторні клітини частіше дозрівають та дають астроглію, якщо в мікрооточенні переважають такі сигнальні молекули, як PDGF, BMP-2/4 та CNTF. Комбінація PDFG+bFGF або PDGF+GGF спрямовує рестрикційну проліферацію прогеніторних клітин у бік олігодендроцитів. Перехід до постмітотичного дозрівання клітин пов'язаний з експресією p27 та p21 – інгібіторів циклінзалежної кінази (Cdk). Механізм запуску мієлінізації поки що залишається не розшифрованим. Комбінація T3 та IGF-1 запускає експресію генів білків мієліну. Якщо активується ген основного протеїну мієліну (MBP – myelin basic protein) та протеоліпідного протеїну (PLP – proteolipid protein), то ген *Krox-24* інгібується. Трансплантація попередників олігодендроцитів у бічні шлуночки мозку щурів різко збільшує число донорних мієлінопозитивних клітин у зонах демієлінізації. На відміну від НСК, попередники олігодендроцитів ефективніше мігрують у білій речовині та накопичуються в ділянках демієлінізації [88].

Важливі наслідки для вивчення можливих шляхів диференціації СК НГ дав метод виділення високоочищеної клоногенної культури КНГ. За допомогою імуносортингу культивованих КНГ вдалося збагачувати популяцію СК прогеніторними клітинами до 80 %, видаливши домішки ендотелію, гладеньком'язових клітин, серицитів, шванівських та інших "більш прогресивних" клітин [89, 90].

Клони НГ, вирощені в культурі, відрізняються вираженою гетерогенністю. Клони вдається багаторазово пасажувати, до того ж клітини в межах сфер зберігають здатність ініціювати клоноутворення та мультипотентність (здатність до диференціації в нейрони, глію, шванівські клітини, міофібробласти та навіть хрящ). Зазвичай клони НГ у культурі диференціюються змішано. Монодиференціація клонів НГ у культурі в нейрони відбувається за допомогою комбінації BMP-2 и BMP-4. BMP у постмітотичних клітинах індукуює експресію *Mash-1*. Монодиференціацію клонів НГ у глію отримують, додаючи GGF (нейрегулін). Для отримання гладеньком'язових клітин з прогеніторних популяцій НГ використовують додавання TGF- β . При пересадці клонів СК НГ у мозок зародків донорні клітини обмежено диференціюються в холінергічні нейрони, причому як в головному мозку, так і на периферії [71]. Інші дослідники також відмічали обмежену пластичність клонів НГ у разі їх пересадки в мозкову та інші тканини реципієнта (порівняння з клонами НСК, виділених з перивентрикулярних відділів мозку) [91]. Виключення складали СК нейроепітеліальної вистилки спинного мозку, які містили в собі попередники нейронів ЦНС та клітин ПНС. У загальній масі цих клітин зустрічалися клони, які були позитивними щодо як нестину та віментину, так і p75 [92]. Вважається, що частина СК спінальної частини НГ мігрують у нервову трубку. Тому потенціал до регенерації спинного мозку є вищим, ніж у головного мозку (очевидно, за рахунок химеризації клітинами нейромезенхіми).

Спадкові дефекти, пов'язані з аномальною диференціацією клітин НГ, тільки почали вивчатися. Наприклад, спадкова хвороба Ваарденбурга пов'язана з дефектами пігментації шкірних покривів та відсутністю вегетативних гангліїв у кишечнику внаслідок мутації рецепторів до ендотеліну-3 у клітин НГ [93]. У наш час СК НГ знайшли нове призначення при лікуванні спадкової м'язової дистрофії, зумовленої дефектом гена дистрофіну. Добре відомо, що у пацієнтів

з дистрофією Дюшена вибірково пошкоджуються м'язи кінцівок, але не обличчя, очей та гортані. Виявилося, що всі м'язи обличчя та шиї, виниклі з клітин НГ, синтезують утрофін (ембріональний дериват дистрофіну), необхідний для нормального функціонування м'язів. Тому всі м'язи обличчя та шиї пацієнтів залишаються неушкодженими. На даний час проводять пересадки фетальних міобластів, лабораторно отриманих із клітин НГ, із ціллю реконструкції м'язів пацієнта з донорних клітин, резистентних щодо даного захворювання. Для цілей трансплантації отримані перші „безсмертні" лінії СК НГ [94].

Важливо підкреслити, що потенціал СК НГ щодо генерації кістково-хрящових структур черепа, тимуса, щитовидної залози, гангліїв та провідної системи серця є унікальним і ці клітини не можуть бути замінені іншими фетальними клітинами. Пересадки НСК ектодермального походження не здатні компенсувати функції прогеніторних клітин НГ. Друга важлива особливість прогеніторних клітин НГ – це висока швидкість та щільність міграції клітин на рекордні відстані [95]. Унікальні можливості нейромезенхімальних клітин в аспекті спрямованої міграції в організмі приваблюють медиків з ціллю репарації клітинних дефектів тимуса, вад кістково-м'язової системи обличчя, а також репарації провідної системи серця. Оскільки периферична частина нервової системи формує значне число адренергічних нейронів симпатичних гангліїв та клітин кори наднирників, актуальними залишаються пошуки програм, які б ефективно управляли монодиференціацією постмітотичних прогеніторних клітин НГ. У наш час практично завершена каталогізація генів-учасників (*Ret*, *Phox2a*, *Phox2b*, ген тирозингідроксилази), що беруть участь у процесах монодиференціації СК НГ [96].

Подальше вивчення потенціалу диференціації СК НГ та шляхів їх міграції, безсумнівно, може бути виключно корисним для розвитку перспективних підходів для покращення клітинної регенеративної медицини.

Отже, на сьогоднішній день трансплантологія вже певною мірою може практично використовувати фундаментальні наукові досягнення в царині дослідження властивостей СК. У даному огляді описано декілька стратегій використання МСК для лікування нейродегенеративних захворювань; ці стратегії зараз активно досліджуються або проходять перший етап доклінічних випробувань. Так, для лікування людей можна використовувати

ти три основних джерела клітин – ембріональні стовбурові, регіональні стовбурові та спеціалізовані соматичні клітини. Але найбільш перспективним та безпечним, очевидно, є використання „дорослих” СК, особливо МСК, які можна отримати різними шляхами [8, 20, 34].

МСК, отримані з різних джерел, можуть бути успішно використані в замісній регенеративній медицині. Відомі результати доклінічного випробування моделей, створених із МСК *in vitro*. Серед них найуспішнішими є випадки регенерації м’язів, шкіри, суглобів, хрящів, зв’язок, кісток, альвеолярної тканини легенів, повітряноносного епітелію верхніх дихальних шляхів, пейсмейкерів серцевої тканини. МСК, що були введені в організм гризунів безпосередньо в кров’яне русло, мігрували та брали участь у відновленні пошкоджених органів – селезінки, кісток, легенів, зв’язок. Для подальшого використання в медицині МСК можуть бути підготовленими у різні способи. Вони можуть застосовуватись як самостійно, так і в складі багатоконпонентних біологічно активних композицій [33]. Проте стурбованість щодо біологічної безпечності застосування таких клітин при розгляді можливості використання генномодифікованих МСК зберігається. Випадкові композиції векторів, які включають в себе гени нейротрофічних або інших факторів, можуть призводити до інсерційної інтеграції. Проте дослідження в галузі гомологічної рекомбінації та цільової доставки генів швидко розвиваються, і прогноз того, що інтеграція МСК найближчим часом стане безпечною, є досить оптимістичним.

МСК, отримані з кордового матеріалу, мають ряд переваг перед іншими дорослими СК. Отримання клітин з пуповини не є конфліктним щодо морально-етичних норм; такі клітини отримуються відносно легко, без будь-якого втручання в організм матері чи плода. Подібні МСК не потребують спеціальних фідерних шарів чи дорогих сполук для поживних середовищ культивування. Введення людських МСК імуносупресованим мишам внутрішньовенно або підшкірно не призводить до відторгнення [8, 20].

Одним із перспективних напрямків дослідження також є використання МСК із людських ембріональних СК та ліній індукованих плюрипотентних СК. Оскільки СК цих двох типів постійно діляться, одержання генетично модифікованих клонів таких клітин з чітко охарактеризова-

ним потенціалом до диференціації в певний тип клітин не зустрічає принципових обмежень та є, безсумнівно, цікавим для їх практичного застосування. Таким чином, у найближчі роки генетично модифіковані клітинні лінії МСК можуть бути використані для лікування широкого спектра захворювань людини, включаючи нейродегенеративні захворювання та гострі мозкові ушкодження.

Автори представленої оглядової статті – О. А. Рибачук і Т. А. Півнева – підтверджують, що у них немає конфлікту інтересів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Д. А. Зубов, “Стволовая клетка: от определения к возможностям клинического применения”, *Трансплантология*, **7**, № 13, 31-39 (2004).
2. В. С. Пикалюк, Р. Л. Шаймарданова, “Современные аспекты системы стволовых клеток”, *Клін. анатомія та оператив. хірургія*, **7**, № 4, 91-100 (2008).
3. Г. Т. Сухих, В. В. Малайцев, И. М. Богданова, “Стволовые клетки. От фундаментальных исследований к клинике”, *Вест. МЕДСИ*, **1**, № 1, 38-44 (2008).
4. О. Г. Дерябіна, О. М. Сухорада, О. О. Маслова, “Мезенхімальні стовбурові клітини пуповини: виділення та мультиплікація *in vivo*”, *Журн. НАМН України*, **16**, дод., 52 (2010).
5. A. Sarnowska, H. Braun, S. Sauerzweig, and K. G. Reymann, “The neuroprotective effect of bone marrow stem cells is not dependent on direct cell contact with hypoxic injured tissue,” *Exp. Neurol.*, **215**, No. 2, 317-327 (2009).
6. J. Kohyama, H. Abe, T. Shimazaki, et al., “Brain from bone: Efficient «meta-differentiation» of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with noggin or a demethylating agent,” *Differentiation*, **68**, Nos. 4/5, 235-244 (2001).
7. M. Secco, E. Zucconi, N. M. Vieira, et al., “Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood!” *Stem Cells*, **26**, No. 2, 146-150 (2008).
8. L. Silva and M. Arnold, “In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells,” *Stem Cells*, **26**, No. 3, 2287-2299 (2008).
9. C. Qiao, W. Xu, W. Zhu, et al., “Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord,” *Cell Biol. Int.*, **32**, No.1, 8-15 (2008).
10. H. S. Wang, S. C. Hung, S. T. Peng, et al., “Mesenchymal stem cells in the Wharton’s jelly of the human umbilical cord,” *Stem Cells*, **22**, No. 7, 1330-1337 (2004).
11. А. Ю. Петренко, В. И. Грищенко, “Трансплантация стволовых клеток – терапия XXI века. Характеристика и свойства стволовых клеток”, *Пробл. криобиологии*, **16**, № 2, 3-12 (2001).
12. Ю. А. Зозуля, Н. И. Лисяний, *Нейрогенная дифференцировка стволовых клеток*, Экспресс-Полиграф, Киев (2005).
13. K. Bieback, S. Kern, H. Kluter, et al., “Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood,” *Stem Cells*, **22**, No. 4, 625-634 (2004).

14. В. Г. Богдан, Ю. М. Гаин, Ю. Е. Демидчик, "Культивирование мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани *in vitro* на хирургических сетчатых эндопротезах «Prolene», «Vurg», «Ultrapro», «Vicyrl», «Proceed», *Мед. журн.*, **72**, № 4, 13-16 (2009).
15. А. А. Айзенштадт, Е. Ю. Кананыхина, В. Б. Климович, А. Б. Смолянинов, "Культивирование мезенхимальных клеток пуповинной крови человека и сравнение их свойств с мезенхимальными клетками костного мозга человека", в кн.: *Тезисы докладов IV Всероссийской научной школы-конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина»*, МГУ, Москва (2011), с. 40-41.
16. В. Г. Климовицкий, В. К. Гринь, В. М. Оксимец и др., "Механизмы влияния мезенхимальных стволовых клеток на репаративный остеогенез", *Травма*, **10**, № 2, 3-14 (2009).
17. Л. Б. Буравкова, "Факторы микроокружения в реализации свойств ММСК", в кн.: *Тезисы докладов IV Всероссийской научной школы-конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина»*, МГУ, Москва (2011), с. 19-20.
18. H. Goodwin, A. Bicknese, S. Chien, et al., "Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat and neural markers," *Biol. Blood Marrow Transplant.*, **7**, No. 1, 581-588 (2001).
19. E. J. Caterson, L. J. Nesti, K. G. Danielson, and R. S. Tuan, "Human marrow derived mesenchymal progenitor cells: isolation, culture expansion, and analysis of differentiation," *Mol. Biotechnol.*, **20**, No. 3, 245-256 (2002).
20. S. Kern, H. Eichler, J. Stoeve, et al., "Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue," *Stem Cells*, **24**, No. 5, 1294-1301 (2006).
21. E. J. Gang, J. A. Jeong, S. H. Hong, et al., "Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood," *Stem Cells*, **22**, No. 4, 617-624 (2004).
22. M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, et al., "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International society for cellular therapy position statement," *Cytotherapy*, **8**, No. 4, 315-317 (2006).
23. C. M. Kolf, E. Cho, and R. S. Tuan, "Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation," *Arthritis Res. Ther.*, **9**, No. 1, 204-214 (2007).
24. M. L. Weiss and D. L. Troyer, "Stem cells in the umbilical cord," *Stem Cell Rev.*, **2**, No. 2, 155-162 (2006).
25. M. Kadivar, S. Khatami, Y. Mortazavi, et al., "Multilineage differentiation activity by the human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells," *Iran. Biomed. J.*, **10**, 175-184 (2006).
26. W. Kafienah, S. Mistry, C. Williams and A. P. Hollander, "Nucleostemin is a marker of proliferating stromal stem cells in adult human bone marrow," *Stem Cells*, **24**, No. 4, 1113-1120 (2006).
27. R. K. Chailakhian, A. I. Fridenshtein, and A.V. Vasil'ev, "Clone formation in monolayer cultures of bone marrow and spleen," *Bull. Eksp. Biol. Med.*, **69**, No. 2, 94-98 (1970).
28. M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, et al., "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells," *Science*, **284**, No. 5411, 143-147 (1999).
29. Y. A. Romanov, V. A. Svintsitskaya, and V. N. Smirnov, "Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord," *Stem Cells*, **21**, No. 1, 105-110 (2003).
30. J. R. Sanchez-Ramos, "Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood," *J. Neurosci. Res.*, **69**, No. 6, 880-893 (2002).
31. Д. О. Зубов, *Остеоімунітет та культивовані мезенхімальні стовбурові клітини*, Автореф. дис ... канд. мед. наук, Київ (2009).
32. В. В. Короленко, А. В. Рибачук, "Високі технології в медицині: проблеми, сучасність і перспективи", *Укр. наук.-мед. молодіж. журн.*, **1**, № 1, 4-10 (2010).
33. J. M. Gimble, F. Guilak, M. E. Nuttall, et al., "In vitro differentiation potential of mesenchymal stem cells," *Transfus. Med. Hemother.*, **35**, No. 3, 228-238 (2008).
34. R. K. Jaiswal, N. Jaiswal, S. P. Bruder, et al., "Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase," *J. Biol. Chem.*, **275**, No. 13, 9645-9652 (2000).
35. C. Chai and K.W. Leong, "Biomaterials approach to expand and direct differentiation of stem cells," *Mol. Ther.*, **15**, No. 3, 467-480 (2007).
36. W. E. Fibbe, "Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair," *Ann. Rheum. Dis.*, **61**, Suppl. 2, 29-31 (2002).
37. J. P. Vogel, K. Szalay, F. Geiger, et al., "Platelet-rich plasma improves expansion of human mesenchymal stem cells and retains differentiation capacity and *in vivo* bone formation in calcium phosphate ceramics," *Platelets*, **17**, No. 7, 462-469 (2006).
38. M. L. Weiss, S. Medicetty, A. R. Bledsoe, et al., "Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease," *Stem Cells*, **24**, No. 3, 781-792 (2006).
39. S. K. Lee and S. L. Pfaff, "Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord," *Nat. Neurosci.*, **4**, Suppl., 1183-1191 (2001).
40. A. R. Alexanian, "Epigenetic modifiers promote efficient generation of neural-like cells from bone marrow-derived mesenchymal cells grown in neural environment," *J. Cell Biochem.*, **100**, No. 2, 362-371 (2007).
41. M. A. Eglitis and E. Mezey, "Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, No. 8, 4080-4085 (1997).
42. В. С. Репин, "Эмбриональная стволовая клетка (от фундаментальной биологии к медицине)", *Успехи физиол. наук*, **32**, № 1, 3-19 (2001).
43. F. H. Gage, "Mammalian neural stem cells," *Science*, **287**, No. 5457, 1427-1438 (2000).
44. K. Nakano, M. Migita, H. Mochizuki, and T. Shimada, "Differentiation of transplanted bone marrow cells in the adult mouse brain," *Transplantation*, **71**, No. 12, 1735-1740 (2001).
45. A. J. Friedenstein, K. V. Petrakova, A. I. Kurolesova, and G. P. Frolova, "Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissue," *Transplantation*, **6**, No. 3, 230-247 (1998).
46. В. П. Новак, М. Ю. Пилипенко, Ю. П. Бичков, *Цитологія, гістологія, ембріологія (підручник)*, ВІРА-Р, Київ (2001).
47. C. LaBonne and M. Bronner-Fraser, "Molecular mechanisms of neural crest formation," *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, **15**, 81-112 (1999).
48. J. H. Christiansen, E. G. Coles, and D. G. Wilkinson, "Molecular control of neural crest formation, migration and differentiation," *Current Opin. Cell Biol.*, **12**, No. 6, 719-724 (2000).

49. C. Guo, B. Wehrle-Haller, J. Rossi, and G. Ciment, "Autocrine regulation of neural crest cell development by SCF," *Dev. Biol.*, **184**, No. 1, 61-69 (1997).
50. R. Mentlein and M. Kendall, "The brain and thymus have much in common: a functional analysis of their microenvironment," *Immunol. Today*, **21**, No. 3, 133-140 (2000).
51. H. C. Etchevers, G. Couly, C. Vincent, and N. M. Le Douarin, "Anterior cephalic neural crest is required for forebrain viability," *Development*, **126**, No. 16, 3533-3543 (1999).
52. H. C. Etchevers, C. Vincent, N. M. Le Douarin, and G. F. Couly, "The cephalic neural crest provides pericytes and SMC to all blood vessels of face and forebrain," *Development*, **128**, No. 7, 1059-1068 (2001).
53. T. Sauka-Spengler and M. Bronner-Fraser, "A gene regulatory network orchestrates neural crest formation," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, No. 7, 557-568 (2008).
54. N. Nikitina, T. Sauka-Spengler, and M. Bronner-Fraser, "Gene regulatory networks in neural crest development and evolution," *Current Topics Dev. Biol.*, **86**, 1-14 (2009).
55. C. Milet and A. H. Monsoro-Burq, "Neural crest induction at the neural plate border in vertebrates," *Dev. Biol.*, **366**, No. 1, 22-33 (2012).
56. S. Kuriyama and R. Mayor, "Molecular analysis of neural crest migration," *Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. Ser. B, Biol. Sci.*, **363**, 1349-1362 (2008).
57. D. E. Clouthier, S. C. Williams, T. E. Yanagisawa, et al., "Signal pathway crucial for craniofacial development revealed by endothelin-1 receptor deficient mice," *Dev. Biol.*, **217**, No. 1, 10-24 (2000).
58. S. J. Kwang, S. M. Brugger, A. Lazik, et al., "Msx is an intermediate downstream effector of Pax3 in the development of the murine cardiac neural crest," *Development*, **129**, No. 2, 527-538 (2002).
59. M. Dottori, M. K. Gross, P. Labosky, and M. Goulding, "The winged-helix transcription factor Foxd3 suppresses interneuron differentiation and promotes neural crest cell fate," *Development*, **128**, No. 21, 4127-4138 (2001).
60. P. D. Henion, G. Blyss, R. An M. Luo, et al., "Avian transiting expression mirrors glial cell fate restrictions during neural crest development," *Dev. Dyn.*, **218**, No. 1, 150-159 (2000).
61. J. Li, J. D. Molkenkin, and M. C. Colbert, "Retinoic acid inhibits cardiac neural crest migration by blocking *c-jun* activation," *Dev. Biol.*, **232**, No. 2, 351-361 (2001).
62. C. Rakic, "Clonal expansion of cells in cerebral cortex," *Novartis Found Symp.*, **228**, 30-42 (2000).
63. A. MacKenzie, M. W. Ferguson, and P. T. Sharpe, "Hox-7 expression during murine craniofacial development," *Development*, **113**, No. 2, 601-611 (1991).
64. E. Dupin, S. Creuzet, and N. M. Le Douarin, "The contribution of the neural crest to the vertebrate body," *Adv. Exp. Med. Biol.*, **589**, 96-119 (2006).
65. N. M. Le Douarin, S. Creuzet, G. Couly, and E. Dupin, "Neural crest cell plasticity and its limits," *Development*, **131**, No. 19, 4637-4650 (2004).
66. N. Le Douarin and C. Kalcheim, *The Neural Crest*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, New York (1999).
67. P. Barraud, A. A. Seferiadis, L. D. Tyson, et al., "Neural crest origin of olfactory ensheathing glia," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, No. 49, 21040-21045 (2010).
68. M. S. Adams and M. Bronner-Fraser, "Review: the role of neural crest cells in the endocrine system," *Endocr. Pathol.*, **20**, No. 2, 92-100 (2009).
69. S. Ruffins and A. M. Bronner-Fraser, "A critical period for conversion of ectodermal cells to a neural crest cells," *Dev. Biol.*, **218**, No. 1, 13-20 (2000).
70. Y. Cheng, M. Cheung, M. M. Abu-Elmagd, et al., "Chick *sox10* transcription factor expressed in both early neural crest cells and CNS," *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **121**, No. 2, 233-241 (2000).
71. P. M. White, S. J. Morrison, K. Orimoto, et al., "Neural crest stem cells undergo cell-intrinsic developmental changes in sensitivity to instructive differentiation signals," *Neuron*, **29**, No. 1, 57-71 (2001).
72. M. Murphy, J. Drago, and P. F. Bartlett, "bFGF stimulates the proliferation and differentiation of neural precursor cells in vitro," *J. Neurosci. Res.*, **25**, No. 4, 463-475 (1990).
73. W. Wang and T. Luskin, "The murine *Otp* homeobox gene plays an essential role in the specification of neuronal cell lineages in the developing hypothalamus," *Dev. Biol.*, **227**, No. 2, 432-449 (2000).
74. V. Calaora, B. Rogister, K. Bismuth, et al., "Neuregulin signaling regulates neural precursor growth and the generation of oligodendrocytes in vitro," *J. Neurosci.*, **21**, No. 13, 4740-4751 (2001).
75. R. Dorsky, R. T. Moon, and D. W. Raible, "Environmental signals and cell fate specification in premigratory neural crest," *BioEssay*, **22**, No. 8, 708-716 (2000).
76. S. J. Morrison, S. E. Perez, Z. Qiao, et al., "Transient *notch* activation initiates irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells," *Cell*, **101**, No. 5, 499-510 (2000).
77. M. Ikeya, S. M. Lee, J. E. Johnson, et al., "Wnt signaling required for expansion of neural crest and CNS progenitor," *Nature*, **389**, No. 6654, 966-970 (1997).
78. S. Chen and R. J. Lechleider, "Transforming growth factor- β -induced differentiation of smooth muscle from a neural crest stem cell line," *Circ. Res.*, **94**, No. 9, 1195-1202 (2004).
79. K. M. Mann, J. L. Ray, E. S. Moon, et al., "Calcineurin initiates smooth muscle differentiation in neural crest stem cells," *J. Cell Biol.*, **165**, No. 4, 483-491 (2004).
80. A. E. Wurmser, K. Nakashima, R. G. Summers, et al., "Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage," *Nature*, **430**, No. 6997, 350-356 (2004).
81. S. Gajavelli, P. M. Wood, D. Pennica, et al., "BMP signaling initiates a neural crest differentiation program in embryonic rat CNS stem cells," *Exp. Neurol.*, **188**, No. 2, 205-223 (2004).
82. C. S. Guo, B. Wehrle-Haller, J. Rossi, and G. Ciment, "Autocrine regulation of neural crest cell development by steel factor," *Dev. Biol.*, **184**, No. 1, 61-69 (1997).
83. L. Hou, J. J. Panthier, and H. Arnheiter, "Signaling and transcriptional regulation in the neural crest-derived melanocyte lineage: interaction between KIT and MITF," *Development*, **127**, No. 24, 5379-5389 (2000).
84. P. R. Riley, M. Gersenstein, K. Dawson and J. C. Cross, "Early exclusion of *hand1*-deficient cells from left ventricular myocardium in chimeric mouse embryos," *Dev. Biol.*, **227**, No. 1, 156-168 (2000).
85. K. J. Fernandes, I. A. McKenzie, P. Mill, et al., "A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells," *Nat. Cell Biol.*, **6**, No. 11, 1082-1093 (2004).
86. M. Sieber-Blum, M. Grim, Y. F. Hu, and V. Szeder, "Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle," *Dev. Dyn.*, **231**, No. 2, 258-269 (2004).

87. B. Rogister, T. Ben-Hur, and M. Dubois-Dalq, "From neural stem cells to myelinating oligodendrocytes," *Mol. Cell Neurosci.*, **14**, Nos. 4/5, 287-300 (1999).
88. R. D. Learish, O. Brustle, S. C. Zhang, and I. D. Duncan, "Intraventricular transplantation of oligodendrocyte progenitors into fetal myelin mutant results in widespread formation of myelin," *Ann. Neurol.*, **46**, No. 5, 716-722 (1999).
89. S. J. Morrison, P. M. White, C. Zock, and D. J. Anderson, "Prospective identification, isolation by flow cytometry of multipotent mammalian neural crest stem cells," *Cell*, **96**, No. 5, 737-749 (1999).
90. D. L. Stemple and D. J. Anderson, "Isolation of stem cells for neuron and glia from the mammalian neural crest," *Cell*, **71**, No. 6, 973-985 (1992).
91. N. M. Shah and D. J. Anderson, "Integration of multiple instructive cues by neural crest stem cells reveals cell-intrinsic biases in relative growth factors," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, No. 21, 11369-11374 (1997).
92. T. Mujtaba, M. Mayer-Proschel, and M. S. Rao, "A common neural progenitor for the CNS and PNS," *Dev. Biol.*, **200**, No. 1, 1-15 (1998).
93. D. F. Newgreen and M. Murphy, "Neural crest cell outgrowth cultures and the analysis of cell migration," *Methods Mol. Biol.*, **137**, 201-211 (2000).
94. M. S. Rao and D. J. Anderson, "Immortalization and controlled *in vitro* differentiation of murine multipotent neural crest stem cells," *J. Neurobiol.*, **32**, No. 7, 722-746 (1997).
95. Y. Rao and Y. Y. Wu, "Neuronal migration and the evolution of human brain," *Nat. Neurosci.*, **4**, No. 9, 860-862 (2001).
96. H. M. Young, D. Ciampoli, J. Hsuan, and A. J. Canty, "Expression of *Ret*, *P75*, *Phox2a*-, *Phox2b*- and tyrosine hydroxylase by undifferentiated neural crest-derived cells," *Dev. Dyn.*, **216**, No. 2, 137-152 (1999).