

тери части МСК во время выделения, а также особенностей культуральной среды, т.к. была использована среда D-MEM, а не DI-MEM. По своей морфологии стромальные клетки человека отличались от мышиных по строению ядра и цитоплазмы (рис. 2.12–2.16). В направленности дифференцировки в нашей системе также имелись отличия, которые заключались в том, что меньше образовывалось остеогенных и хондроцитоподобных элементов, положительно окрашивающихся ализариновым красным.

Таким образом, в результате проведенных исследований было показано, что в популяции адгезирующих клеток костного мозга

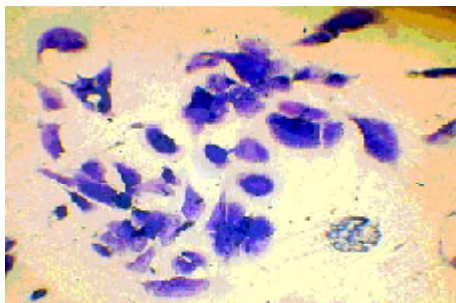


Рис. 2.12. Скопления фибробластоподобных клеток, выросших из костного мозга человека на 10-е сутки культивирования. Окраска азур II-эозином, ув. 600х

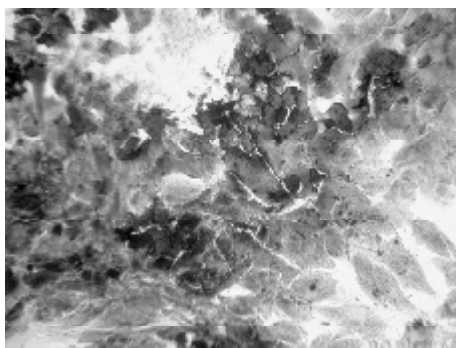


Рис. 2.13. Фрагмент колонии фибробластоподобных клеток, выросших из костного мозга человека на 14-е сутки культивирования. Окраска азур II-эозином, ув. 600х

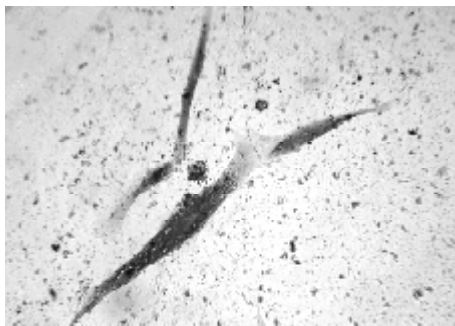


Рис. 2.14. Миоцитоподобные клетки, выросшие из костного мозга человека на 14-е сутки культивирования. Окраска азури II-эозином, ув. 600х



Рис. 2.15. Фибробластоподобные клетки, выросшие из костного мозга 37-летней женщины на 18-е сутки культивирования. Окраска гематоксилин-азуром, ув. 900х

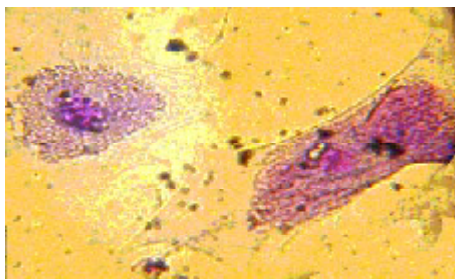


Рис. 2.16. Адипоцит и фибробластоподобная клетка, выросшие из костного мозга 37-летней женщины на 14-е сутки культивирования. Окраска гематоксилин-азуром, ув. 900х

человека и животных (мыши, крысы) присутствуют прогениторные стромальные клетки, способные в культуре ткани формировать многочисленные колонии, состоящие из клеток разной степени зрелости и направленности дифференцировки, т.е. мультипотентных СК (рис. 2.12–2.16). Эти МСК при пересеве переходят в активную фазу клеточного роста с формированием новых колоний.

2.4. МЕЗЕНХИМОПОЗЗ

Стромальные клетки составляют популяции клеток, которые в костном мозге формируют специфическое гемопоэзиндуцирующее окружение (ГИМ), которое создает оптимальный режим функционирования кроветворных СК за счет регуляции процессов пролиферации и дифференцировки для гемопоэтических СК (ГСК) и их потомков в норме и патологии (Чертков, Гуревич, 1984; Дыгай, Шахов, 1989; Schofield, 1978).

Мезенхимальные клетки формируют соединительную ткань по всему организму. Эти клетки способны трансформироваться в кардиомиоциты, скелетные и гладкомышечные миоциты, фибробласты, остеобласты, хондроциты, адипоциты, эндотелиальные и другие типы клеток (Bianco et al., 2000, 2001; Deans et al., 2000; Minguell et al., 2001).

Изучение экспрессии разнообразных маркеров на стромальных клетках человека и животных в долгосрочных культурах костного мозга установило, что они являются потомками МСК, несущих маркер для сосудистых гладкомышечных клеток (СГМК) (Bianco et al., 1999).

СГМК являются интересной моделью для изучения свойств и функций МСК. Основные работы по данной проблеме выполнены на двух главных линиях, выделенных из костного мозга человека и крыс.

Первая была получена из первичной культуры стромальных элементов, а вторая – из Stro-1⁺ клеток. Они имеют характерные маркеры для цитоскелета и экстрацеллюлярного (внеклеточного) матрикса (ЭЦМ), часто специфические для СГМК комплекса (Galmiche et al., 1993; Lerat et al., 1993; Li et al., 1999). Следует отметить, что аналогичные линии клеток, несущие маркер СГМК, обнаружены не только в костном мозге, но и желточном мешке, области аортогонадо-нефрона, фетальной печени и селезенки, что, очевидно, свидетельствует о перемещении этих клеток в эмбриогенезе, во многом повторяющем путь миграции

гемопоэтических СК (Remy-Martin et al., 1999; Char-bord et al., 2000).

Актин является одним из самых ранних маркеров, появляющихся на гладкомышечных клетках, а также изоформах фибронектина, имеющих экстрадомен с RGD-зависимым, связывающим клетки, сайтом. Позднее появляются белки цитоскелета типа метавинкулина, h-кальдесмона, ламинина, актин-связывающего винкулина, кальпонины и миозина. В некоторых линиях стромальных клеток мышцы обнаруживается десмин и промежуточные специфические для мышц филаменты (Owens et al., 1995; Remy-Martin, 1999; Charbord et al., 2000).

Оказалось, что популяция стромальных клеток гетерогенна и может изменять направление своей дифференцировки в зависимости от их физиологии или при патологических состояниях (Desmouliere et al., 1995).

Так, наблюдения ранней стадии развития стромы человека в долгосрочных культурах позволили выявить последовательность образования белков, которые экспрессируются всеми типами мезенхимальных клеток, включая МСК (Galmiche et al., 1993; Lerat et al., 1993; Li et al., 1995; Charbord et al., 1999). Более того, стромальные клетки всех линий, независимо от происхождения, экспрессируют виментин, ламинин и остеопонтин. Хорошо известен факт, что виментин представляет собой промежуточный нитевидный белок, широко представленный в клетках мезенхимального происхождения. Ламинин и фибронектин обнаружены на СГМК до стадии гастрюляции, а остеопонтин – в течение этого процесса развития эмбриона (Remy-Martin et al., 1999; Cooper et al., 1983; Thiery et al., 1988; Thayer et al., 1995).

По-видимому, из-за специфического распределения в естественных условиях виментина, ламинина, фибронектина и остеопонтина можно считать, что они являются достаточно адекватными маркерами мезенхимальных клеток, в частности, выявляемых в длительных культурах *in vitro* типа Декстера (Charbord et al., 2000).

Стромальные клетки-предшественники человека могут быть выделены с использованием моноклональных антител против Stro-1-антигена (Simmons, Torok-Storb, 1991). У животных эти клетки выявлены с использованием моноклональных антител против Thy-1, молекулы адгезии сосудистых клеток 1-го типа, эндогликана, субъединицы α -1-интегрина и CD 146 (Guerriero et al., 1997; Filshie et al., 1998; Majumdar et al., 2000; Deschaseaux, Charbord, 2000; Simmons et al., 2001).

У мышей стромальные предшественники можно сортировать с использованием анти-Sca-1-антител (van Vlasselaer, 1994). Технически данный тип прекурсоров может быть выявлен в жидкой (Фриденштейн, Лалыкина, 1973) или полувязкой среде (Sensebe et al., 1995).

Было показано, что эндотелиальные клетки экспрессируют молекулы СГМК. При этом часть эндотелиальных клеточных линий и первичных культур могут изменить свой фенотип. Так, например, клетки, экспрессирующие фактор Виллебранта, начинают проявлять СГМК-фенотип под влиянием трансформирующего ростового фактора- α (Amberger et al., 1991; Schor et al., 1997).

Эмбриональные эндотелиальные клетки, выделенные из стенки аорты, проявляют трансдифференцировку с экспрессией ASMA-рецепторов при перемещении их в субэндотелиальную область (DeRuiter et al., 1997; Gittenberger et al., 1999). ЭСК, имеющие рецептор 1 для сосудистого эндотелиального фактора роста (СЭФР), способны дифференцироваться в эндотелиоциты в ответ на СЭФР в СГМК (Yamashita et al., 2000).

В пределах гемопоэтических участков мезенхимальные или эндотелиальные СК способны дифференцироваться в зрелые формы под влиянием аутокринных молекул экстрацеллюлярного матрикса и цитокинов. Такая гипотеза соответствовала бы модели, высказанной P. Bianco et al. (1999), в которой гемопоэзу предшествовал процесс инвазии сосудов. Это подтверждает, что формирование ГИМ в костном мозге 2-недельного плода человека и активация процесса продукции эндотелиальных клеток предшествуют их колонизации гемопоэтическими элементами (Chagbord et al., 1996). Возможно, такой процесс можно использовать при проведении клеточной терапии инфаркта миокарда и СН.

Различные медиаторы по-разному экспрессируются и секретируются эндотелиальными клетками, что, очевидно, играет важную роль в рекрутировании и дифференцировке МСК и СГМК (Cooper et al., 1983; Owens, 1995; Desmouliere, Gabbiani, 1995; Owens et al., 1996; Hungerford, Little, 1999; Miano, Berk, 2000). Этот процесс, по-видимому, происходит при сложном взаимодействии между ростовым фактором, высвобождающимся из тромбоцитов (РФВТ), другими тканевыми факторами и эндотелиином (Li et al., 1999).

Кроме того, нельзя исключить, что данный механизм контролируется и другими, пока еще не идентифицированными, макромолекулами, способствующими индукции продукции факторов

транскрипции, в частности миогенез-усиливающего фактора-2С (МУФ-2С) (Lin et al., 1998).

Во многом подобный процесс наблюдается при инфаркте миокарда и формировании рубцовой ткани. И в этом случае активация стромогенеза всегда предшествует ангиогенезу (Непомнящих, 1991).

Дифференцировка МСК и СГМК, очевидно, регулируется за счет сочетанного действия ряда стимулирующих молекул, таких как ТРФ- α , фактор роста фибробластов-2 (ФРФ-2), инсулиноподобный фактор роста (ИПФР), эндотелин, ангиотензин-II, гепарансульфат, ламинин, коллаген-IV и ретиноиды, а также и ингибирующие молекулы типа РФВТ, интерферон и фибронектин. Более того, сама форма клетки также играет важную роль в дифференцировке МСК в сторону мышечных и гладкомышечных элементов (Yang et al., 1999; Mask et al., 2001).

В контроле за ростом МСК важную роль играют разнообразные цитокины и ростовые факторы (ФРФ, ТФР, γ -интерферон, ФНО, интерлейкины-1, -6, РФВТ и др.). Эффекты данных молекул в системе *in vitro* во многом зависят от условий культивирования, типа сыворотки, среды, субстрата и количества пассажей. При этом такие факторы, как РФВТ и ТФР, при взаимодействии с экстрацеллюлярным матриксом способствуют мышечной и гладкомышечной дифференцировке МСК (Sensebe et al., 1997; Serini, Gabbiani, 1999).

С другой стороны, сами по себе стромальные клетки участвуют в создании гемопоэзиндуцирующего микроокружения, синтезируют множество цитокинов и молекул адгезии (Чертков, Гуревич, 1994; Charbord, 2001). Они вовлечены в перенос гемопоэтических клеток в синусах, а также определяют характер соединения эндотелия (Lichtman et al., 1998). Кроме того, мезенхимальные клетки определяют хоминг и, следовательно, рециркуляцию стволовых кроветворных клеток за счет экспрессии хемокинов, в частности путем продукции стромального высвобождающего фактора 1-го типа (Bleul et al., 1996).

Очевидно, в обычных условиях процессы физиологической регенерации мышечной, костной, соединительной ткани, печени и др. осуществляются за счет собственных сателлитных и (или) СК клеток. При действии экстремальных факторов, стрессе, повреждениях или травмах собственного резерва не хватает, и поступление МСК происходит из центрального органа костного мозга или депо, например, жировой ткани. Так, часть эндогенных МСК, в том числе и циркулирующих, после эксперименталь-

ной травмы способны рекрутироваться в мышечные, гладкомышечные и другие типы клеток, играя роль дополнительного пластического материала, достигая области повреждения ткани (Nap et al., 2001).

Происхождение новых клеток при репарации могло бы быть объяснено фенотипическим и функциональным сходством между мезенхимальными клетками костного мозга и СГМК. Обе эти популяции локализуются в одном и том же органе. Это предположение соответствует данным S. Kuznetsov et al. (2001), которые сообщили о циркуляции мезенхимальных прекурсоров, дающих начало образованию СГМК, остеогенным клеткам и адипоцитам.

Как уже было сказано выше, МСК костного мозга способны к дифференцировке в адипоциты, хондроциты, остеобласты, элементы ГИМ, скелетную, гладкомышечную и сердечную мускулатуру (Попов и др., 2004; Шахов и др., 2003, 2004; Caplan, 1991; Prockop, 1997; Pittenger et al., 1999; Dennis et al., 1999; Dennis et al., 2002). МСК с мультипотентными свойствами присутствуют в эмбриональной печени человека в первый триместр развития плода.

При этом остается неясным, как происходит взаимодействие между МСК и ГСК (Campagnoli et al., 2001). По мнению M. Reyes et al. (2001), МСК, очевидно, образует все типы клеток, входящих в состав ГИМ.

Учитывая все вышесказанное, можно полагать, что МСК формируют микроокружение не только для костного мозга, но и для других органов и тканей, включая сердце и сосуды.

Способность к самообновлению со стороны МСК достаточно трудно определить из-за низкого уровня кругооборота этих клеток в обычных условиях. Пластичность мезенхимального происхождения клеток не совсем соответствует тому уровню, который теоретически можно наблюдать у стволовых клеток с высокой способностью к самообновлению.

Кроме того, если в других системах, например кроветворной, есть строгое соответствие между ежедневными потерями клеток, которые равняются от 10^9 до 10^{11} клеток на 1 кг веса, и их восстановлением (Чертков, Фриденштейн, 1977), то для мезенхимопозза в обычных условиях данное правило практически не работает.

В частности, показан кругооборот костных структур, протекающий за счет слаженной работы остеокластов и остеобластов, однако параметры его точно не установлены. Оказалось, что не

все костные структуры регенерируют с одинаковой скоростью (Pereira et al., 1998). Более того, медуллярная часть трубчатой кости замещается гораздо быстрее, чем кортикальная. При травме, генетических мутациях продукции коллагена, недостаточности работы паращитовидной железы и повреждении костного мозга может наблюдаться супрессия процесса образования кости из МСК (Gazit et al., 1990; Whitfield et al., 1996; Lucas et al., 1997; Mundy, 1999).

Еще одна отличительная особенность данных прекурсоров заключается в том, что происхождение дифференцированных потомков из МСК не имеет таких четких границ, как для зрелых элементов гемопоэтической ткани. Можно полагать, что данный процесс протекает на уровне одного или нескольких клонов. Интересно, что МСК, вставшие на тот или иной путь дифференцировки, могут сохранять маркеры других клеточных линий. Так, гипертрофические хондроциты дают положительную реакцию на остеокальцин, щелочную фосфатазу, основной связывающий фактор транскрипции A1 (ОСФТа1), способны формировать минерализованный матрикс, что характерно для остеогенных элементов (Bennett et al., 1991; Chen et al., 1991; Gentili et al., 1993; Roach et al., 1995).

Мезенхимальные клетки человека с СГМК-фенотипом позитивны на щелочную фосфатазу и коллаген, являющиеся ранними маркерами остеобластических клеток. Кроме того, они могут содержать включения липидов, что делает их сходными с адипоцитами, а также миофибриллы, связанные с фибронексусом, что характерно для скелетных и сердечных мышечных клеток (Dennisa et al., 2000). Учитывая эти данные, ряд авторов придерживается мнения о стохастической модели репрессии и индукции мезенхимных стволовых клеток (Dennisa, Charbordb, 2002). Во многом стохастическая модель для МСК напоминает таковую, описанную для гемопоэтических СК (Чертков, Гуревич, 1984; Lemischka, 2001).

Другой точкой зрения, которая основывалась на изучении поведения МСК *in vitro*, является иерархическая модель дифференцировки данных клеток, т.к. в культуре ткани никакие биопотентные предшественники не выявлялись (рис. 2.17) (Muraglia et al., 2000; Minguell et al., 2001). В то же время, иерархическая модель также не может в полной мере объяснить выявленную пластичность МСК, в частности их способность дифференцироваться в переходные формы, обладающие мультипотентным дифференцировочным потенциалом (Gimble, 1990).

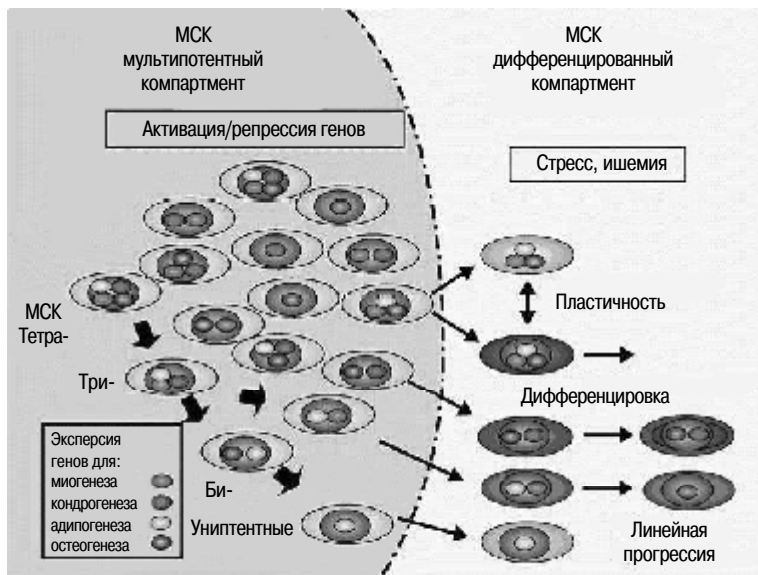


Рис. 2.17. Стохастическая модель мезенхимопоза в костном мозге (по Muraglia et al., 2000, с дополнениями)

Вероятно, МСК содержат широкий набор генов, способных включить или выключить ту или иную программу развития стволовых клеток. Этот контроль может осуществляться через различные механизмы, включая диметилирование, деацетилирование ДНК, модификации структуры хроматина и другие, пока еще не выявленные, механизмы (Bird, Wolffe, 1999). Происходит ли данный процесс случайно или под действием какого-либо фактора – остается неясным.

Мы считаем, что коммитирование на уровне МСКн является случайным, стохастическим процессом. Однако после их рекрутирования в пул МСКк дальнейшая дифференцировочная программа осуществляется не за счет репрессии или активации четырех групп генов, как считают J. Dennisa, P. Charbordb (2002), ответственных за коммитирование в сторону образования стромальных, костных, хрящевых, жировых клеток, а гораздо большего набора генетического материала, т.к. мезенхимальные прекурсоры способны образовывать кроме вышеупомянутых карио-

цитов еще и мышечные, сосудистые и другие элементы (рис. 2.6–2.16, табл. 2.1).

Согласно стохастической гипотезе, процессы репрессии и активации МСК не являются строго детерминированными. При этом МСК при развитии полностью не утрачивают способность к изменению направленности дифференцировки. Можно полагать, что данный процесс под действием внешних факторов (гормонов, цитокинов или молекул адгезии) регулируется изменением их соотношения и комплексного воздействия на МСК, коммитированные одновременно по нескольким гистогенетическим линиям. Интегральное преобладание тех или иных факторов определяет выбор основного направления дифференцировки.

Стимуляция МСК с экспрессией их фенотипа в ту или иную сторону идет за счет активации или супрессии мастер-гена. Данная концепция впервые была подтверждена на примере *MyoD*-фактора транскрипции мышц, способного стимулировать экспрессию целого набора мышечных специфических генов (Buckingham, 1994).

В 1986 г. Lassar et al. ввели ДНК мышечной ткани в фибробластоподобные клетки линии $C3H10_{1/2}$, имеющие мезенхимальные потенции. В результате они трансформировались в мышечные клетки. ДНК, выделенная из фибробластов или других клеток, такую реакцию не вызывала. Далее было показано, что такой же способностью обладает м-РНК, полученная из миобластов. Установлено, что эта мРНК инициирует выработку 1-го протеина, получившего название *MyoD* (Davis et al., 1987). *MyoD*-ген экспрессируется только в клетках мышечной линии. Было высказано предположение, что этот ген выполняет роль "master-switch" – главного переключателя, приводящего к передифференцировке клеток других линий в мышечные. Для проверки этой гипотезы *MyoD*-ген был клонирован и введен в вирусный вектор так, чтобы он был связан с активным вирусным промотором и находился в так называемом включенном состоянии. Оказалось, что когда эту систему вводили в разные типы клеток (пигментные, нервные, жировые, печеночные, фибробласты и др.), то они трансформировались в мышечноподобные элементы (Weintraub et al., 1989).

MyoD кодирует ядерные ДНК-связанные протеины. Они могут прикреплять регионы ДНК, примыкающие к мышечным специфическим генам, и затем их активировать. Например, *MyoD*-протеины проявляют направленную активацию мышечно-специфического гена креатин-фосфокиназы, которые связываются в

ДНК непосредственно выше их прикрепления (Lasser et al., 1989). Соответственно, существуют два сайта связывания MyoD в ДНК, расположенные рядом с субъединицами генов для рецепторов к ацетилхолину в мышцах птиц (Piette et al., 1990). Они также могут направленно самоактивировать себя. Один MyoD-ген продуцирует белки, связанные с ДНК, рядом с другим геном MyoD и включает его (Thager et al., 1989). В другом случае эффект MyoD-гена может не проявляться.

Не все гены проявляют мышечный фенотип прямым путем. MyoD способен к не прямой активации других регуляторных генов, которые затем активируют структурно-мышечно-специфические гены. MyoD — это не только "выключатель" мышечных генов. Имеется семейство MyoD-подобных протеинов, имеющих очень сходную структуру и действие. Эта группа получила название MyoD-семейство или миокинов (Mytkins) и включает продукцию миогенина, Myt-5 и Myt-6, которые располагаются в соседнем регионе ДНК. Перенос этих генов в различные типы культивируемых клеток также экспрессирует в них мышечный фенотип. MyoD экспрессирует миогенин. С другой стороны, миогенные гены активируют MyoD и ряд других генов (Thager et al., 1989).

У эмбрионов птиц MyoD активирует стволовые клетки уже на ранней стадии развития сомитов, которые покрывают нейральную трубку. По мере созревания сомитов в них экспрессируется Myt-5-ген. Часто склеродермальные клетки содержат рассеянную популяцию миотомных клеток, экспрессирующих MyoD-1, Myt-5- и Myt-6-протеины (Pownale, Emerson, 1992). Возможно, что клетки нейральной трубки секретируют факторы, повышающие уровень экспрессии этих протеинов в соседних соматических клетках, и превращают их в мышечные на стадии сомитов (Packard, Jacobson, 1976; Vivarelli, Cossu, 1986; Rong et al., 1992).

У мышей наблюдалась несколько иная последовательность. Первым продуцируются Myt-5-протеины в эпителиальных клетках сомита, покрывающих нейральную трубку (Lyons, Buckingham, 1996). Myt-6-белки экспрессируются позднее, на ранней миотомной стадии. MyoD-гены и MyoD-протеины не являются прямыми факторами, начинающими дифференцировку миообластов. Они являются мессенджерами для мышечно-специфических контактных протеинов, вызывая их транскрипцию (Sasson et al., 1984). Эти Myt-5- и Myt-6-единицы развиваются на ранней стадии дифференцировки мышечных клеток. При этом в миобластах MyoD и миогенин вызывают их слияние. Использо-

ние мышей с различными дефектами генов *MyoD*, *Myt-5* и *Myt-6* показали, что они способны взаимодействовать друг с другом (Hasty et al., 1993; Nabeshima et al., 1993). Другими регуляторами миогенеза являются:

- *миостатин*, который относится к суперсемейству ТФР- β и является гомодимером. Проявляет роли негативного регулятора роста скелетных мышечных клеток, концентрация возрастает при развитии гипертрофии мышечной массы;
- *ростовой фактор для рецептор-связанного протеина-2* ассоциируется с активированным тирозин-фосфорилированным СЭФР-рецептора и ФРВТ-рецептора, регулирует дифференцировку миогенных клеток;
- *гепатоцитарный ростовой фактор* является миогенным ростовым фактором, регулирует эмиграцию миобластов из сомита в лимбическую область;
- *с-MET: HGF рецептор*, поддерживающий выживаемость и пролиферацию миобластов в течение миграции;
- *кальцинейрин* стимулирует кальцийзависимые кальмодулин-стимулированные протеины фосфатазы, стимулирует мышечную гипертрофию;
- *MEF-2-семейство* содержит миоцит-специфические повышающие факторы 2A, 2B, 2C, индуцируют созревание и мышечную дифференцировку.

Таким образом, *MyoD*-семейство генов выполняет две основные функции. Одна связана с коммитированием незрелых стволовых клеток в мышечные линии. Другая сопровождается активацией специфических мышечных генов, генерирующих мышечно-специфические энзимы и сократительные белки. У мышей *MyoD* и *Myt-5* способны к передифференцировке соматических клеток в мышечные – миобласты (Pinney et al., 1989). Миогенин может затем индуцировать превращение миобластов в миотубы, а *Myt-6* вызывает образование мышечно-специфических белков и созревание в миотубах зрелых миофибрилл.

Последующие исследования показали, что миогенная дифференцировка регулируется набором факторов транскрипции, которые включают *MyoD*, *Myf5*, миогенин и *MRF4*. Кандидаты в мастер-гены для других мезенхимальных клеток были также идентифицированы. В частности, оказалось, что существует гамма-рецептор-2 пероксисомного активатора пролиферации (ГРПАП) для адипоцитов, *Cbfa1* – для остеобластов. ГРПАП способствует индукции трансформации фибробластов в адипоциты

(Tontonoz et al., 1994). Кроме того, адипогенез регулируется и другими генами типа *wnt-10b* (Fajas et al., 1998; Ross et al., 2000). В свою очередь, было показано, что СК жировой ткани способны трансформироваться в мышечные, костные, хрящевые клетки, включая кардиомиоциты (Zak et al., 2000; Gojo, Umezawa, 2003). С другой стороны, была установлена важная роль *wnt-10b* и *GATA-2,3*-генов в супрессии адипогенеза (Ross et al., 2000; Tong et al., 2000). Изучая гистогенез в мышах с нокаутом гена *Cbfa1*, было показано, что он необходим и для развития кости (Ducy et al., 1997; Ducy et al., 1998). Под его воздействием неостеогенные стромальные клетки превращаются в остеогенные (Satomura et al., 2000). Более подробно вопросы адипогенеза описаны в обзоре М. Francine et al. (1998).

Линейная репрессия, очевидно, является общим механизмом регуляции МСК. Одним из примеров таких мессенджеров, которые модулируют дифференцировку МСК через реPRESSION ядерного Т-фактора. При выключении гена ядерного Т-фактора (ЯТФ) у мышей наблюдается экспрессия хондрогенеза в экстрацеллюлярной области соединительной ткани. Хондрогенную индукцию также вызывает реPRESSION ЯТФ-гена, а повышенная экспрессия данного гена, напротив, угнетает образование хрящевой ткани из МСК (Lecka-Czernik et al., 1999; Ranger et al., 2000).

Таким образом, мезенхимальной ткани присущи все черты, характерные для любой системы. Она имеет центральный орган — костный мозг, циркулирующий пул и периферический отдел. Однако отличительной особенностью мезенхимопоэза, например, от гемопоэза является то, что он сохраняет черты незрелой эмбриональной ткани, которой присуща достаточно большая пластичность. Четкую границу между центральным и периферическим отделами провести чрезвычайно трудно. МСК способны к одновременному развитию по нескольким направлениям, т.е. они имеют "плавающий" фенотип. Очевидно, данный процесс находится под влиянием многочисленных индуктивных и супрессорных факторов, которые часто действуют одновременно. Это сопровождается появлением маркеров для разных типов дифференцировки и затрудняет идентификацию клеток. Другая интересная особенность МСК, отличающая их от кроветворных, кишечных и эпидермальных СК, заключается в том, что дифференцированные потомки данных клеток способны к реверсии, т.е. к экспрессии генов материнских клеток. Интересно то, что их дифференцировка не является необратимой и они могут включать различные пути своего дальнейшего развития. С теоретических

позиций мультилинейность МСК может быть объяснена стохастической моделью, где пластичность коммитированных клеток открывает дифференцировочный компартмент. Этот механизм, по-видимому, носит общебиологический характер, т.к. во многом аналогичная функциональная "гибкость" наблюдается и у немезенхимальных элементов, в частности, у нейро-эктодермальных (нейроны, астроциты и олиго-дендроциты) и энтодермальных (гепатоциты) стволовых клеток (Sanchez-Ramos et al., 2000; Woodbury et al., 2000; Oh et al., 2000).

2.5. МСК ИЗ ДРУГИХ, НЕ КОСТНОМОЗГОВЫХ, ИСТОЧНИКОВ ВО ВЗРОСЛОМ ОРГАНИЗМЕ

МСК можно выделить не только из костного мозга, но и из других тканей взрослого организма. Однако вопрос, насколько эти клетки идентичны МСК костномозгового генеза, обладают такой же пластичностью и пролиферативным потенциалом, остается неясным. С другой стороны, строма костного мозга может иметь генетические дефекты, что затрудняет проведение клеточной терапии и требует поиска иных источников МСК. Это чрезвычайно важно при разработке правильной тактики лечения больных с той или иной патологией и для предупреждения негативных явлений.

2.5.1. МСК из жировой ткани

Теоретически количество МСК, определяемых в жировой ткани, сопоставимо (и даже может превышать) с таковым в костном мозге. Однако их способность к мобилизации МСК из жирового депо, по-видимому, ограничена (Zak et al., 2000). Стромальные клетки жировой ткани содержат МСК на разных этапах развития, а также стромально-васкулярные клетки (СВК), которые считаются слабо дифференцированными прогениторными жировыми клетками. В организме СВК под действием холода или тепла активируются и, по-видимому, превращаются в адипоциты (Bukowiecki et al., 1986; Rajkumar et al., 1999). Как СВК, так и МСК костномозгового происхождения могут дифференцироваться в адипоциты под действием глюкокортикоидов, ИПРФ-1 и инсулина (Grecoire et al., 1998; Rajkumar et al., 1999). Это свидетельствует в пользу того, что СВК представляют собой вид коммитированных мезенхимальных прогениторных клеток, нахо-

дящихся в жировой ткани и обладающих мультипотентным потенциалом дифференциации, поскольку они способны дифференцироваться в адипоциты, хондроциты, кардиомиоциты, миоциты и нейральные клетки (Hellstrom et al., 1999, Zak et al., 2002). Являются ли МСК костного мозга и жировой ткани идентичными по своим морфофункциональным свойствам, остается малоизвестным. В частности, их антигенный состав не идентичен. Так, жировые МСК экспрессируют CD49d (4-интегрин), а костномозговые – нет. С другой стороны, на костномозговых МСК определяется CD106, которого нет в адипоцитарных МСК. Кроме того, между ними имеются различия в кинетике роста и качественного состава колоний (Dennis et al., 2001, 2002). Исследования, проведенные с использованием клонированных клеток, выделенных из насыщенного жиром костного мозга, подтвердили предположение, что исходные клетки, находящиеся в жировой ткани, обладают большим потенциалом дифференциации. Установлено, что исходные клетки, находящиеся в жировой ткани, способны дифференцироваться в адипоциты и остеобласты (Park et al., 1999). Появились единичные сведения о возможности части МСК жировой ткани формировать кардиомиоциты. Кроме того, стромальные клетки жировой ткани секретируют факторы, стимулирующие ангиогенез, и ингибируют апоптоз (Rehman et al., 2004). Это может быть использовано в дальнейшем при комбинированном введении МСК, выделенных из костного мозга и подкожной клетчатки, для усиления эффективности проведения клеточной терапии. Однако эти данные требуют проверки и более углубленного исследования.

2.5.2. МСК из мышечных клеток

В результате проделанной работы над скелетными мышцами взрослого человека доказано существование клеток со свойствами ранних миогенных исходных клеток (Williams et al., 1999). При проведении данного исследования было замечено, что после ферментативной диссоциации ткани и культивирования клетки образующаяся первичная культура формируется из смеси звездчатых клеток и многоядерных миотрубок. После изоляции и культивирования клеток в среде, содержащей лошадиную сыворотку, клетки растут без каких-либо признаков дифференциации. Однако когда клетки помещались в другую среду, в которой присутствовал дексаметазон, они вновь начинали дифференцироваться.

Как следует из морфологического и гистохимического анализов, дифференцированная популяция содержала клетки с фенотипом скелетных и гладких мышц, кости, хряща и жира. Хотя условия культивирования, использованные при проведении данного эксперимента (лошадиная сыворотка и добавка к желатину), отличаются от условий, в которых обычно растут и развиваются МСК из костного мозга, результаты эксперимента указывают на то, что в скелетных мышцах присутствуют коммитированные МСК (Conget, Minguell, 1999; Digirolamo et al., 1999; Pit-tenger et al., 1999).

Эти опыты не исключают вероятности того, что и некоммитированные МСК также могут быть обнаружены в мышечной ткани. Они отличаются от "сателлитных" клеток, находятся в состоянии покоя и способны при пересеве переходить в активную фазу роста с образованием многочисленных колоний, т.е. рекрутироваться в коммитированный пул мезенхимальных прекурсоров (Baroffio et al., 1995; Beauchamp et al., 1999; Gross, Morgan, 1999). На некоммитированном этапе развития мезенхимальные исходные клетки, находящиеся в скелетной мышце, равно как и линия клеток C2, продолжают оставаться незрелыми одноядерными клетками, даже если они подвергаются дифференцированным стимулам (Yoshida et al., 1999). Клетки не только скелетных мышц, но и других видов, таких как сердечная мышца, проявляют свойства мезенхимальных исходных клеток.

Ранее считалось, что в норме в сердечной ткани взрослого организма нет прогенераторных клеток. Однако оказалось, что это не совсем так. В частности, примитивные стволовые клетки, способные дифференцироваться в миоциты, были идентифицированы в области предсердий. Они несли характерные поверхностные маркеры, такие как c-kit, MDR1 и Sca-1. Кроме того, здесь же были выявлены предшественники для эндотелиальных и гладкомышечных клеток (Anversa, Nadal-Ginard, 2002; Nadal-Ginard et al., 2003). Однако при инфаркте миокарда или других патологиях сердца эти клетки, как, впрочем, и циркулирующие МСК, в силу пока еще не расшифрованных механизмов, не способны к ремоделированию поврежденной ткани. Это затрудняет их применение в регенераторной медицине.

2.5.3. МСК из костной ткани

Для того чтобы получить представление о характеристиках и потенциале дифференциации находящихся в кости мезенхималь-

ных исходных клеток из костной ткани, использовали ряд экспериментальных подходов. В ходе одного из этих экспериментов из первичных культур выделили и отобрали четыре подгруппы клеток в соответствии с характерными образцами проявления гена-маркера (STRO-1) стромальной клетки-предшественника и остеобластного гена-маркера щелочного фосфатазы (ЩФ) (Gronthos et al., 1999). Подгруппа клеток STRO-1⁺/ЩФ⁺ проявила преостеобластный фенотип. В отличие от остеобластов, они обладают сниженной способностью формировать минерализованный межклеточный матрикс кости, а также характеризуются отсутствием костного сиалопротеина, остеопонтина и рецептора гормона окологипофизной железы на своей поверхности. Другие группы клеток соответствовали промежуточным и полностью готовым формам созревающих и дифференцированных остеобластов. После отбора и рекультивирования только клетки из STRO-1⁺/ЩФ⁺ субпопуляции смогли генерировать все четыре подгруппы STRO-1/ЩФ клеток, присутствовавших в первоначальной культуре.

Это свидетельствует о том, что культуры человеческой кости не однородны, в них содержатся бипотентные (остеогенные/адипогенные) прекурсоры (Nuttall et al., 1998). Путь дифференциации, избираемый этими клетками, определяется рядом факторов, таких как жирные кислоты, ИЛ-1 β и/или ТФР- β .

Мультипотентные свойства проявляет клон клетки RCJ 3.1, извлеченный из черепного свода эмбриона крысы. Он способен под действием индукторов дифференцироваться в четыре мезенхимальных фенотипа. Так, под влиянием аскорбиновой кислоты, β -глицерофосфата, дексаметазона из него образуются мышечные клетки (9–10-й день), адипоциты (12-й день), хондроциты (после 16-го дня) и костная ткань (после 21-го дня) (Grigoriadis et al., 1988; 1990). Кроме МСКк в костной ткани, по крайней мере, в процессе эмбриогенеза можно выделить и некоммитированный пул МСК, который имеет медленный цикл развития, не проявляет связанные с дифференцировкой маркерные гены, а при помещении в культуру формирует мышечные, хрящевые, жировые, костные клетки (Zohar et al., 1997; Ghilzon et al., 1999). Возможно, именно за счет остеогенного, а не костномозгового пула МСКн происходят процессы репарации и регенерации костной ткани при переломах и травмах (Liu et al., 1994).

Таким образом, в культурах МСК костного происхождения присутствуют как некоммитированные, так и коммитированные МСК.

2.5.4. МСК из хрящевой ткани и сухожилий

В организме суставная хрящевая ткань имеет ограниченную способность к восстановлению. Обычно для ее выделения используют набор ферментов, ключевым из которых является гиалуронидаза. Предполагается, что, несмотря на присутствие в ней МСК, способных проявлять хондроцитарный фенотип, их количество в восстанавливаемой ткани ограничено (Komaki et al., 1996; Metsaranta et al., 1996; Toma et al., 1997; Fujimoto et al., 1999). Причины этого феномена остаются неясными. По-видимому, пролиферативный потенциал МСК (или способность к перемещению клеток, выделенных из хрящевой ткани) достаточно низок, т.к. они не способны восстанавливать поврежденные структуры хряща при травме (Urist et al., 1978; Shapiro et al., 1993; Boyan et al., 1999).

Мало работ посвящено изучению вопроса выявления МСКк в сухожилиях. Так, используя метод серийного культивирования теноцитов из пяточного сухожилия молодого кролика, было показано, что культуры клеток первой и второй генерации сохраняли маркерные гены дифференцировки для коллагена I типа и декорина, характерные для тендоцитов. Однако при последующих пересевах клетки начинают проявлять модулированный фенотип (Bernard-Beaubois et al., 1997). Несмотря на огромное количество информации по факторам, которые регулируют рост клеток сухожилий вне живого организма, данных о происхождении ткани и условиях коммитирования находящихся в сухожилии клеток-предшественников практически нет (Becker et al., 1981; Haniff, Abrahamsson, 1996; Wiig et al., 1996; Abrahamsson, 1997; Kang, Kang, 1999).

2.5.5. МСК сосудистого генеза

Практически все сосуды формируются в эмбриогенезе из эндотелиальной трубки, на которой впоследствии образуется слой сосудистых гладкомышечных клеток (перicyтов) (СГМК), развивающихся, в свою очередь, из МСК. Периваскулярные МСК сходны во многом по своим морфофункциональным свойствам с костномозговым отделом мезенхимопоза. Выше мы обсуждали эти свойства для СГМК при рассмотрении вопроса о пластичности МСК. Несмотря на то, что данный класс прекурсоров проявляет ряд свойств, характерных для МСК костного мозга, в частности по отношению к экспрессии гладкомышечного актина, рецепторов для высвобождающего из тромбоцитов ростового фак-

тора, тем не менее, они являются нетождественными стволовыми клетками (Galmiche et al., 1993; Hellstrom et al., 1999). Так, МСК сосудистого происхождения (из пупочного канатика) в культуре ткани имеют фенотип CD29⁺, CD44⁺, CD14⁻, CD45⁻. Они формируют хондрогенные клетки, экспрессирующие коллаген II и IX типов, скелетные миоциты (положительные на α -актин, калпонин, калдесмин, α -тяжелая цепь миозина), кроветворные элементы CD-34⁺, но не жировые клетки (Tintut et al., 2003).

2.6. МОБИЛИЗАЦИЯ МСК

Считается, что костный мозг является центральным органом мезенхимопоза. Из него МСК выходят, транспортируются через кровь и распределяются в отдаленных отделах мезенхимальной ткани (Caplan, 1994; Mingel et al., 2001). Механизм этого процесса малоизучен. Возможно, в процессе мобилизации МСК проходят стадию коммитирования и дифференцировки, в соответствии с запросом от периферического отдела. Предполагается, что этот процесс осуществляется в специфических для мезенхимальных клеток нишах, которые регулируют процесс их развития (Lazarus et al., 1997; Watt, Hogan, 2000). Морфологический субстрат этих ниш для костного мозга до настоящего времени не определен. После создания критической массы МСК, подготовленной для дальнейшей экспансии, стволовые клетки поступают в кровоток. При этом периферическая кровь и, очевидно, лимфа должны представлять собой транспортное средство для перемещения МСК к месту назначения, т.е. в нужную микро-среду той или иной ткани. В результате хоминга прогениторные фибробластоподобные клетки прикрепляются к клеткам и/или компонентам экстрацеллюлярного матрикса и начинают пролиферировать и дифференцироваться в соответствующем локальному микроокружению направлении. Попадая в ту или иную ткань, МСК способны к локальной миграции, что подтверждают опыты при изучении восстановления хряща, костной ткани, регенерации мышц, нервной ткани (Carnes et al., 1997; Kopen et al., 1999).

Следует отметить, что факт присутствия циркулирующих МСК, (КОЕф) в крови взрослого человека в обычных условиях, пока еще не установлен. Данный феномен доказан лишь для животных (Фриденштейн, Лurie, 1980; Reading et al., 2000). Ряд авторов считает, что у людей циркулирующие МСК появляются только при действии экстремальных факторов, например цито-

статиков или цитокинов типа гранулоцитарного и гранулоцито-макрофагального колониестимулирующих факторов (Г-КСФ, ГМ-КСФ), или при патологических процессах (Piersma et al., 1983; Ojeda-Urbe et al., 1993; Lazarus et al., 1997; Fernandez et al., 1997; Reading et al., 2000).

При этом, какой именно класс МСК – коммитированный или некоммитированный – покидает костный мозг, также остается невыясненным. От решения этого вопроса во многом зависит тактика проведения клеточной терапии, в частности, острого инфаркта миокарда, например, за счет мобилизации МСК из костного мозга с помощью цитокинов. Если окажется, что происходит выброс МСКн, обладающих низкой пролиферативной активностью, то при попадании в сердце они не успеют реализовать свой пролиферативный потенциал и образовать необходимое количество новых КМЦ, позволяющее осуществить эффективную кардиомиопластику.

Другим негативным последствием стимуляции выброса МСК из костного мозга в фазу активации стромогенеза в миокарде после инфаркта может быть образование из них вместо мышечных клеток-фибробластов и усиления роста рубца. Кроме того, Г-КСФ и ГМ-КСФ активируют функцию нейтрофилов, макрофагов, гемопоэтических СК, что может усилить воспалительную реакцию не только вокруг зоны инфаркта, но и в местах проведения хирургического вмешательства, например, коронарорешунтирования.

Еще одним косвенным доказательством того, что МСК человека способны к циркуляции, является факт их обнаружения в пуповинной крови. Они проявляют свойства, во многом аналогичные для костномозговых прогениторных клеток стромы, и дифференцируются в остеонидные, хондральные и адипогенные элементы.

Более того, в культуре таких клеток около 5–10% можно отнести к классу некоммитированных МСК. Существует прямая корреляция между стадией гестации плода и количеством циркулирующих МСК (Shields et al., 1998; Erices et al., 2000). Однако МСК костного мозга значительно лучше развиваются в культуре, образуя колонии, быстрее "набирают биомассу" и легче дифференцируются, чем МСК пуповинной и периферической крови (Wexler et al. 2003). Следовательно, циркулирующие и иммортализованные в костном мозге МСК представляют собой либо разные категории клеток, либо разные функциональные состояния одной и той же популяции прекурсоров.

2.7. СТРОМАЛЬНОЕ МИКРООКРУЖЕНИЕ ДЛЯ МСК

Поддержание жизнедеятельности СК любого генеза осуществляется не только дистантными механизмами (гормонами, цитокинами, нервными импульсами и т.п.), но и локальным микроокружением той или иной ткани. Каждая ткань имеет свое специфическое микроокружение, среди которого достаточно условно можно выделить гуморальный и клеточный компоненты. Они во многом определяют дальнейшую судьбу СК, попадающих в ту или иную зону индуцирующего микроокружения. Особенностью мезенхимопозза является то, что клетки сами создают для себя базовую основу для микроокружения.

Стромальное микроокружение (СМ), по-видимому, контролирует процесс ассиметричного деления, характерного для мультипотентных клеток, в частности МСК и ГСК (Дыгай, Шахов, 1989; Murgela et al., 2001). Помимо этого, СМ вырабатывает факторы, являющиеся своеобразным счетчиком, определяющим количество делений стволовых клеток. Очевидно, этот механизм реализуется с участием теломеразы (Watt, 1998).

Стромальное микроокружение не ограничивается только элементами, входящими в состав костного мозга стромальных мезанциотов, эндотелия, резидентных макрофагов, остеобластов, но, особенно при экстремальных воздействиях (стресс, воспаление, некроз, инфаркт и т.п.), может принимать в свой состав и другие клетки, в частности Т-лимфоциты и макрофаги. Вместе они создают динамическую систему, способную к стимуляции, супрессии, сужению или расширению плацдарма СМ (табл. 2.5, рис. 2.18). Так, в экспериментах на животных было показано, что стресс сопровождается активацией СМ, которую можно регистрировать путем переноса костного мозга под капсулу почки. В результате формируется новый очаг кроветворения за счет пролиферации и дифференцировки стромальных клеток, переносящих гемопоэз-индуцирующее микроокружение (ГИМ) (Дыгай, Шахов, 1989; Шахов, 1991; Шахов и др., 1995; Карлов, Шахов, 2001).

Способно ли стромальное микроокружение, по аналогии с гемопоэзом, обладать индуцирующими по отношению МСК свойствами практически не известно. Ниже мы коснемся вопросов о роли Т-лимфоцитов и макрофагов в регуляции функции стромальных СК, ответственных за перенос ГИМ.

Интересной моделью для изучения стромального микроокружения является способ эктопического костеобразования (Фри-



Рис. 2.18. Фиброзная, хрящевая, жировая, сосудистая ткань с единичными мышечными элементами, выращенные на кальцийфосфатной керамике (диаметр пор около 250 мкм) методом эктопического костеобразования из костного мозга мышей линии СВА на 45-е сутки культивирования. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. 400х

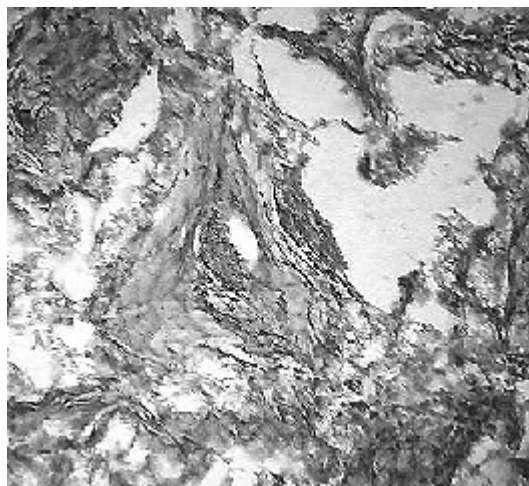


Рис. 2.19. Незрелая остеοидная ткань, содержащая хрящевые клетки и вновь образованные капилляры, выращенная на КФ керамике (диаметр пор около 250 мкм) методом эктопического костеобразования из костного мозга мышей линии СВА на 45-е сутки культивирования. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. 400х

Таблица 2.5

Динамика содержания общего количества миелокариоцитов (ОКК), гранулоцито-макрофагальных колониеобразующих единиц (ГМ-КОЕ), КОЕф, клеточности и массы "первичного" (коммитированные МСК) и "вторичного" (некоммитированные МСК) эктопических очагов кроветворения из костного мозга мышей F₁(СВАхС57Вl/6), подвергнутых 10-часовой иммобилизации

Время после иммобилизации, сут.	ОКК, $\times 10^6$	ГМ-КОЕ, $\times 10^4$	КОЕф, $\times 10^6$	МСКк		МСКн	
				Клеточность, $\times 10^6$	Масса, мг	Клеточность, $\times 10^6$	Масса, мг
Контроль	19,2	4,2	9,5	3,6	1,2	2,1	1,0
3	19,9	19,9	14,1*	8,6*	0,9	4,5*	1,1
5	19,8	16,4*	15,3*	7,9*	2,0	3,3*	0,5
6	24,8*	8,5*	9,7	5,5	1,7	3,0	1,2
7	29,1	7,0	8,1	3,8	1,1	2,5	0,1
8	14,5	4,1	9,3	—	—	—	—

Примечание: * — $P < 0,05$.

денштейн, Лалыкина, 1973; Карлов, Шахов, 2002). Если фрагмент костного мозга нанести на кальциофосфатную поверхность с определенным содержанием Са/Р и специфическим микрорельефом пористой поверхности (диаметр пор от 100 до 300 мкм) и имплантировать материал под кожу, то через 1–1,5 месяца из него образуется ткань, содержащая костные, хрящевые, жировые, мышечные элементы, пронизанные новыми капиллярами (рис. 2.18, 2.19). Очевидно, это свидетельствует о том, что в имплантируемом костном мозге присутствуют МСК, обладающие мультипотентностью.

Скорее всего, данную систему следует использовать для моделирования процессов склерозирования тканей, в частности, при изучении патогенеза кардиосклероза и атеросклероза, когда наблюдаются изменения в направленности дифференцировки МСК и процессы кальцификации исследуемого объекта.

2.7.1. Роль Т-лимфоцитов и мононуклеарных фагоцитов в регуляции функции стромальных клеток, переносящих ГИМ

Ранее нами было показано, что при стрессе происходит последовательная каскадоподобная активация нейро-эндокринной, Т-лимфоцитарной и ретикулоэндотелиальной систем, приводя-

шая к стимуляции процессов пролиферации и дифференцировки кроветворных клеток-предшественников и КОЕф. Этот процесс сопровождается гиперплазией костномозговой ткани и лейкоцитозом и эритроцитозом (Шахов 1996, 1997). Учитывая то обстоятельство, что кроветворная и костно-хрящевые ткани тесно взаимосвязаны, логично было предположить, что подобный механизм может играть важную роль в стимуляции стромальных прогениторных клеток типа МСК, ответственных за перенос костномозгового микроокружения (Чертков, Гуревич, 1984). Стресс представляет собой неспецифическую реакцию и развивается в ответ на действие любых чрезвычайных раздражителей, включая травму, инфаркт миокарда, тепловое или холодное воздействие и т.п. (Шахов, 1991; 1997). Это достаточно простая и удобная модель, позволяющая изучить одновременно как дальнеранговые, так и локальные механизмы регуляции функции элементов, входящих в состав СМ и ГИМ.

Опыты проводились на мышах линии СВА или гибридах F_1 (СВАхС57В1/6). Стресс-реакция вызывалась путем иммобилизации мышей в течение 10 часов. Эктопическая трансплантация осуществлялась по методу M. Tavasolli, R. Khademi (1980), для чего клетки костного мозга имплантировали под капсулу почки донора (рис. 2.20). Через 7 суток часть реципиентов забивали, и образовавшийся "первичный" хондро-стромальный очаг переносили под капсулу почки интактным реципиентам. Масса образовавшейся хрящевой ткани подчитывалась через 1 месяц после трансплантации. Ряд животных получал Thy-1-монокло-

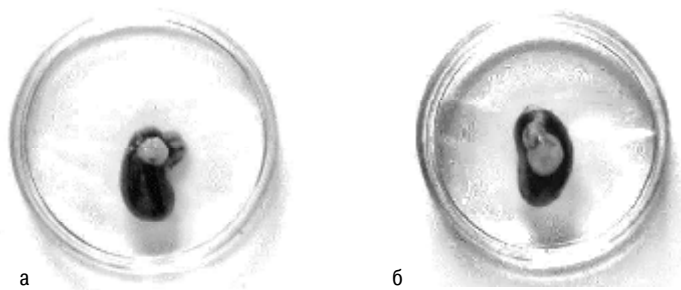


Рис. 2.20. Первичный эктопический очаг, выросший из клеток костного мозга мышей F_1 (СВАхС57В1/6) под капсулой почки, мышей контрольной (а) и подвергнутых 10-часовой иммобилизации (б) групп

Таблица 2.6

Влияние блокады системы Т-лимфоцитов (с помощью Thy-1.1 моноклональных антител) и мононуклеарных фагоцитов (каррагинан) на стромальные СК, переносящие ГИМ и КОЕФ, образовавшиеся в костной ткани интактных и стрессированных мышей F₁(CBAxС57Bl/6)

Масса эктопического очага, в мг				КОЕФ, $\times 10^5$			
Контроль	Стресс	Стресс+ Thy	Стресс + карр.	Контроль	Стресс	Стресс + Thy	Стресс + карр.
0,33 $\pm$ 0,1*	0,95 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,01*	0,33 $\pm$ 0,01*	12,1 $\pm$ 0,9*	27,1 $\pm$ 1,3	6,9 $\pm$ 0,5*	7,7 $\pm$ 0,9*

Примечание: * – при $P_0 < 0,05$ по сравнению с нестрессированными животными.

нальные антитела для блокады Т-клеток (титр 1:32) по 0,5 мл ежедневно в течение 3 суток с момента иммобилизации. Другим животным внутрибрюшинно вводили каррагинан 50 мг/кг для супрессии функции макрофагов. Результаты проведенных исследований представлены в табл. 2.6.

Представленные данные свидетельствуют о том, что стимуляция прогениторных СК, ответственных за перенос ГИМ, находится под контролем локальных механизмов, действующих с участием Т-лимфоцитов и клеток системы мононуклеарных фагоцитов, т.к. угнетение их функции не приводит к увеличению клеточности и массы эктопического очага (Shakhov et al., 1999). Наиболее вероятно, что эти регуляторные клетки осуществляют контроль над процессами пролиферации и дифференцировки МСК через секрецию ростовых факторов типа ФСК, ТВФР, kit-с и других цитокинов, количество которых резко возрастает при стрессе.

Еще один важный вывод, который можно сделать из представленных данных, заключается в том, что в построении СМ и ГИМ участвует согласованный ансамбль разнородных клеток, включая МСК и ГИМ. Одни из них выступают в качестве пластического материала (МСК, стромальные клетки костного мозга, переносящие ГИМ), другие регулируют скорость образования и массу новой ткани. Третью группу составляют посредники, в частности Т-лимфоциты и макрофаги, между вышестоящими регуляторными системами (нейро-эндокринной) и исполнительными органами. Можно с достаточно большой уверенностью утверждать, что Т-клетки и макрофаги принимают участие в создании специфического микроокружения не только в костном

мозге, но и в других тканях и органах, в частности в сердце и сосудах.

2.8. ГИПОТЕЗА О СУЩЕСТВОВАНИИ "НИШИ" ДЛЯ МСК В ВИДЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ – МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ОСТРОВКА

Предполагается, что процессы "хранения", пролиферации и дифференцировки СК осуществляются в специальных "нишах" – структурно-функциональных единицах той или иной ткани. М. Bessis (1963) одним из первых показал, что в костном мозге существуют специфические структурно-функциональные комплексы, состоящие из центральной клетки (макрофага) и окружающих его эритроидных элементов различной степени зрелости. В них происходит процесс созревания элементов красной крови, начиная от эритроидных колониеобразующих единиц и заканчивая ретикулоцитами (Захаров, Рассохин, 2002; Гольдберг и др., 1998). При этом макрофаг играет роль своеобразного регулятора, контролирующего процессы пролиферации и дифференцировки окружающих его эритроидных элементов. Кроме того, было установлено, что и для миелоидных клеток существуют аналогичные клеточные системы (Шахов, 1986; Crocker, Cordon, 1985).

Ранее нами было показано, что не только макрофаги, но и фибробласты (рис. 2.21), а также эндотелий могут выполнять роль центральной регулирующей клетки (Дыгай, Шахов, 1989; Гольдберг и др., 1992).

Интересно, что часть гемопоэтических островков может при введении в селезенку летально облученных мышей формировать колонии. Причем структура колоний состоит из островков разной степени зрелости, начиная от недифференцированных элементов, заканчивая зрелыми гранулоцитами и эритроцитами (рис. 2.22). Это свидетельствует о репликации как гемопоэтического, так и стромального компонентов данных образований (Шахов и др., 1999; Shahov et al., 1999). Возможно, что в структуре гемопоэтических островков находится прекурсор, общий для кроветворных и стромальных элементов, например, типа мезенхимальных стволовых клеток (МСК), обеспечивающих образование центральной и кроветворных клеток.

Теоретически МСК могут формировать структурно-функциональные образования в виде островков (Шахов и др., 2004). Следует еще раз учесть тот факт, что природа и свойства стро-

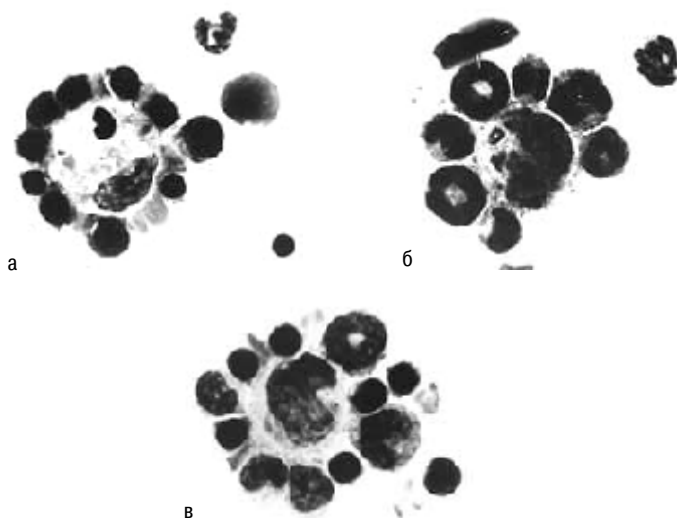


Рис. 2.21. Гемопозитические островки эритроидного (а), гранулоцитарного (б) и эритрогранулоцитарного (в) типов. Азур II-эозин, ув. 900х

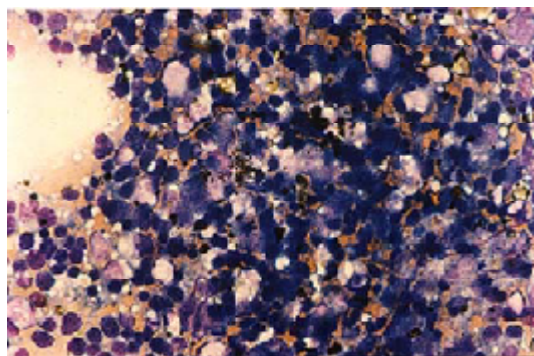


Рис. 2.22. Мазок-отпечаток среза колоний, состоящих из меченных коллоидным углем макрофагов гемопозитических островков, выросших на 7-е сутки после трансплантации в селезенку летально облученных мышей линии СВА пяти маркированных ГО. Колония содержит в своем составе многочисленные островки (эритроидного, миелоидного, эритромиелоидного и недифференцированных типов). Распределение метки идет от центра колонии. Окраска азур II-эозином, ув. 900х