

## Биологические свойства гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови

С.А. Румянцев, Е.Ю. Осипова, С.Е. Ипатов, Т.В. Шаманская, О.А. Майорова, А.Г. Румянцев  
ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии  
Минздравоохранения России, Москва

Контакты: Сергей Александрович Румянцев s.roumiantsev@niidg.ru

*Обзор литературы посвящен анализу эволюции изучения пуповинной крови как источника гемопоэтических стволовых клеток для трансплантации. Поэтапно описано развитие технологий определения и выделения стволовых клеток, оценки их способности к пролиферации и дифференцировке и функциональных характеристик с помощью методов культивирования in vitro и с помощью выращивания in vivo на животных моделях. Описаны различия стволовых клеток пуповинной крови в сравнении с другими тканевыми источниками. Показана роль микроокружения для самообновления и дифференцировки стволовых клеток. Исследованы возможности моделирования биологических свойств стволовых клеток на примере использования векторной конструкции на основе вируса иммунодефицита человека 1 типа, содержащей гены Notch, для регулирования пролиферации CD133<sup>+</sup> и CD34<sup>+</sup> гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови человека.*

*Ключевые слова:* гемопоэтические стволовые клетки, пуповинная кровь, CD133<sup>+</sup> клетки, CD34<sup>+</sup> клетки

### Biological properties of cord blood hematopoietic stem cells

S.A. Rumiantsev, E.Yu. Osipova, S.E. Ipatov, T.V. Shamanskaya, O.A. Mayorova, A.G. Romyantsev  
Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow

*This article provides an overview of research evolution of umbilical cord blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation. Phased developments of the technology of stem cells detection and selection, their proliferation, differentiation and function assessment using cultivation in vitro and in vivo in animal model was described. Differences of cord blood stem cells in comparison with those from other sources were described. The role of microenvironment for stem cells self-renewal and differentiation is shown. The possibility of stem cells biological properties modeling on example of using a vector based on HIV type 1 containing Notch genes, to regulate CD133<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup> cord blood stem cells proliferation is shown.*

*Key words:* hematopoietic stem cells, cord blood, CD133<sup>+</sup> cells, CD34<sup>+</sup> cells

Первая трансплантация клеток пуповинной крови была проведена в октябре 1988 г. Реципиент — 6-летний мальчик, которому ввели пуповинную кровь его сестры [1], — лечился по поводу гематологических проявлений анемии Фанкони, выжил и хорошо себя чувствовал более 16 лет после трансплантации. Эта операция, так же как и последующие трансплантации пуповинной крови по поводу анемии Фанкони [2–4], ювенильного хронического миелолейкоза [5] и других злокачественных и незлокачественных заболеваний [6] проводились клетками от HLA-совместимого донора-сиблинга. До настоящего времени было проведено более 8000 родственных и неродственных трансплантаций, при которых использовалась полностью (шесть шестых) или частично (пять шестых, четыре шестых и три шестых) HLA-совместимая пуповинная кровь [1–6]. Клинические результаты обнадеживают, и нет сомнений, что пуповинная кровь содержит долго жи-

вущие, способные восстанавливать популяцию костного мозга, стволовые клетки. Они могут быть использованы для лечения ряда злокачественных и незлокачественных заболеваний.

Однако существует ряд проблем, которые необходимо преодолеть для частого использования трансплантаций пуповинной крови у взрослых и детей с большей массой тела. Большинство процедур трансплантаций пуповинной крови проведено у детей, и, хотя описано успешное приживление у взрослых и детей с большой массой тела, количество клеток, собранных при одной процедуре сбора пуповинной крови, рассматривается недостаточным для большинства взрослых.

Усилия исследователей были направлены на компенсацию лимитирующего количества собранных клеток пуповинной крови. Среди них попытки *ex vivo* экспансии гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) из пуповинной крови. Клинические экс-

перименты в направлении *ex vivo* экспансии стволовых клеток не внушают оптимизма, что связано с решением вопроса, можно ли подвергнуть экспансии или даже поддерживать жизнедеятельность клеток, обладающих долговременной способностью восстанавливать популяцию клеток костного мозга, при условиях культивирования, которые, как известно, необходимы для экспансии более зрелых пролиферирующих клеток в пределах категории стволовых клеток. Для продвижения вперед исследований по *ex vivo* экспансии, без сомнения, необходимо лучшее понимание ростовых характеристик стволовых клеток и того, что регулирует их пролиферацию, самообновление и выживаемость.

Продукция клеток крови представляет собой иерархию стволовых и коммитированных клеток-предшественников, продуцируемую конвейерным способом [7]. Самые ранние, наиболее незрелые клетки имеют наибольший потенциал самообновления и долговременную способность к восстановлению популяции костного мозга. В популяции стволовых клеток существуют и другие клетки, но они имеют меньшую способность к самообновлению или существуют среди компартмента впоследствии развивающихся клеток-предшественников. Эти клетки обладают кратковременной способностью к восстановлению популяции костного мозга. В костном мозге взрослых стволовые клетки и клетки-предшественники присутствуют в концентрации менее чем 1/1000 — 1/10 000, но, вероятно, в пуповинной крови их концентрация несколько больше [8]. В настоящее время имеется 2 пути для характеристики ГСК и клеток-предшественников. Один путь — с помощью фенотипических маркеров, которые распознают компоненты поверхности клеток, например, антигены кластеров дифференцировки (cluster of differentiation antigens — CD). Однако фенотип не всегда повторяет функцию клеток, особенно после их культивирования *ex vivo*. Другим путем является характеристика этих клеток через функциональную активность — способность стволовых и клеток-предшественников формировать потомство.

#### **Фенотип, оцененный с помощью поверхностных клеточных маркеров**

Наиболее используемым фенотипическим маркером для человеческих стволовых и клеток-предшественников является CD34 — гликофосфопротеин [9, 10], однако о его функции известно очень немного. Хотя CD34 и используется в качестве важного клинического маркера ГСК, он также найден на клетках, которые не являются стволовыми или клетками-предшественниками (например, эндотелиальные клетки) [11]. Само по себе наличие CD34 не отличает стволовые клетки от клеток-предшественников, или даже подтипы клеток в пределах категории ство-

ловых или клеток-предшественников, хотя распределение плотности CD34 антигенов на поверхности клеток иногда используется в этом отношении. Клетки, экспрессирующие наибольшую плотность CD34 антигена (CD34<sup>+++</sup>), соответствуют популяции клеток, высоко обогащенной самыми ранними клетками [10]. Для оценки степени зрелости клетки используются и другие поверхностные клеточные маркеры, включая CD38 [12], Thy1 [13], *c-kit* [14] и Flt3/Flk-2 [15, 16], а также суправитальная окраска родамином-123 [17, 18]. Комбинированное использование этих маркеров является наиболее информативным для определения подтипов стволовых и клеток-предшественников. Так, CD34<sup>+</sup>-клетки, являющиеся также CD38<sup>-</sup>, Thy1<sup>low</sup>, *c-kit*<sup>+</sup>, Flt3<sup>+</sup> и/или родамином-123<sup>low</sup>, рассматриваются как наиболее ранние клетки в процессе развития. Популяция CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>-клеток содержит более зрелые клетки-предшественники, чем те, которые найдены в CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-популяции. Фенотипическое считывание клеточных типов является более быстрым, чем функциональные исследования, например, измерение пролиферативной способности. Кроме того, фенотипирование служит важным инструментом для физической сепарации и очистки популяций и субпопуляций этих клеток, однако фенотипирование имеет свойственные ему ограничения. Фенотип не обеспечивает достоверной информации относительно способности клеток к самообновлению, пролиферации или дифференцировке, если фенотипический анализ не проводится в комбинации с функциональным исследованием клеток в пределах типизируемой популяции, кроме того, фенотипы не всегда устойчиво экспрессируются. Отмечено, что ГСК и клетки-предшественники могут также быть найдены в популяции CD34<sup>-</sup>-клеток [19–21]. Ситуация относительно CD34<sup>+</sup> против CD34<sup>-</sup> характеристик стволовых и клеток-предшественников осложняется индуцируемостью и вариабельностью CD34-антигенов на клетках [22]. Кроме того, после проведения экспансии *ex vivo* многие предшественники не экспрессируют CD34-антигены [23]. Фенотипические маркеры полезны, пока исследователи учитывают ограничения в их использовании. Стволовые и клетки-предшественники в свежесыведенной пуповинной крови экспрессируют, вероятно, главным образом те же фенотипические маркеры, как и эти клетки в костном мозге взрослых, исключая экспрессию HLA-DR-антигенов, которая, вероятно, отсутствует или экспрессируется на очень низком уровне на примитивных клетках костного мозга, но высоко экспрессируется на примитивных клетках пуповинной крови [17, 24].

Молекулярное фенотипирование стволовых и клеток-предшественников находится в процессе разработки [25–28] и может, в конечном итоге, позволить более точную характеристику, чем поверхностное фенотипирование.

### Оценка пролиферации, дифференцировки и функции клеток с помощью методов культивирования *in vitro*

Имеется несколько путей для функциональной оценки ГСК. Для коммитированных клеток-предшественников и более зрелых подтипов стволовых клеток (тех, которые, вероятно, не имеют долговременной способности к восстановлению популяции *in vivo*) используют методы роста клеток в полутвердой питательной среде, типа агара, агарозы или метилцеллюлозы, или в суспензионной среде [29, 30]. Полутвердые питательные среды позволяют получить характерные колонии. Эти колонии происходят из отдельных клеток, которые являются стволовыми клетками с ограниченной способностью к самообновлению или клетками-предшественниками [10, 31, 32]. Стволовая клетка/клетка-предшественница, дающая начало колонии, может быть распознана по дифференцированному потомству в колонии. Анализ колоний позволяет идентифицировать клетки, называемые стволовыми клетками, колониеформирующие клетки с высоким пролиферативным потенциалом (HPP-CFC), мультипотентные колониеформирующие единицы (CFU-GEMM) и более линейно ограниченные предшественники типа CFU-GM (способность к гранулоцитарной и макрофагальной дифференцировке), CFU-G (способность к гранулоцитарной дифференцировке), CFU-M (способность к макрофагальной дифференцировке), CFU-Mega (способность к мегакариоцитарной дифференцировке) и BFU-E (бурст-формирующая единица — эритроидная, способная к эритроидной дифференцировке). Способность пересаживать отдельные колонии с одной чашки на другую с развитием вторичных колоний предоставляет оценку способности к самообновлению первоначальной клетки, которая дала начало первичной колонии, особенно когда и первичная и вторичная колонии являются мультилинейными. Репопуляция стволово-клеточных и HPP-CFC колоний помещает эти клетки в категорию стволовых клеток. Хотя CFU-GEMM, CFU-GM, CFU-G, CFU-M, CFU-Mega и BFU-E рассматриваются как клетки-предшественники без способности к самообновлению, имеются признаки, что некоторые подтипы CFU-GEMM могут быть отнесены скорее к более поздней, более зрелой категории стволовых клеток, чем к категории ранних клеток-предшественников [31, 32].

Пуповинная кровь содержит более высокую концентрацию стволовых клеток, чем костный мозг взрослых [8, 32]. Подсчет концентрации основывался на количестве образованных колоний относительно количества посаженных клеток. Фактически это была оценка количества CFU-GEMM, BFU-E и CFU-GM предшественников, которая привела к возникновению предположения, что пуповинная кровь может служить источником пересаживаемых клеток, и что она может использоваться с этой целью

у взрослых, так же как у детей [8]. Кроме того, пролиферативная способность [8, 10, 32, 33] и способность к восстановлению гемопоэза [10, 31, 32] этих типов клеток в пуповинной крови, вероятно, выше, чем в костном мозге.

Анализы с долговременными культурами клеток в суспензионной среде, в которых рост клеток поддерживается компонентами стромальных клеток и/или цитокинами, также демонстрируют ростовые характеристики клеток пуповинной крови [23, 32, 35, 36]. Клетки, иницирующие долговременные культуры (LT-CIC), которые могут быть распознаны с помощью долговременных клеточных культур, растущих с поддержкой стромальных клеток или комбинации экзогенно добавляемых цитокинов, идентифицируют клеточную популяцию более раннюю и более примитивную, чем таковая HPP-CFC, CFU-GEMM, BFU-E, CFU-GM, CFU-G, CFU-M и CFU-Mega [7, 30]. Однако доказательства того, что LT-CIC являются эквивалентными наиболее ранним ГСК, не убедительны. Углубленный анализ LT-CIC показал, что CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-клетки пуповинной крови имеют более высокую клоногенную эффективность, быстрее пролиферируют в ответ на стимуляцию цитокинами и генерируют почти в 7 раз больше потомков, чем их костномозговые партнеры [12].

### Функция, оцененная с помощью выращивания клеток *in vivo* на животных моделях

Стволовые клетки, обладающие способностью долговременного восстановления популяции костного мозга, были определены и с помощью исследований, использующих животные модели *in vivo*. В этих моделях оценивается долговременная способность восстановления популяции донорскими клетками, введенными мышам, облученным летально при некомпетентном микроокружении, или с добавлением клеток от сингенных мышей [7, 32]. Имеется возможность использования *in vivo* моделей, использующих в качестве реципиентов для приживления человеческих клеток мышей с различными формами тяжелого комбинированного иммунодефицита (ТКИН, англ. SCID), при исследовании человеческих стволовых клеток [32, 37–39]. В этих моделях пуповинная кровь, вероятно, имеет более высокую способность к приживлению, чем клетки костного мозга взрослого. Эти человеческие SCID-восстанавливающие клетки (SRC) найдены только во фракции клеток, экспрессирующих высокий уровень CD34-антигена и не имеющих CD38-антигена на своей клеточной поверхности [37]. Концентрация SRC в пуповинной крови при определении с помощью анализа с ограниченным разведением составляет 1 на  $9,3 \times 10^5$  клеток, что значительно выше, чем концентрация (1 SRC на  $3 \times 10^6$  клеток) в костном мозге взрослого или 1 на  $6 \times 10^6$  мобилизованных ростовым фактором клеток периферической крови от

здорового донора [39]. Тот факт, что имеется только около 1 SRC на 600 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-клеток [37], еще более подчеркивает необходимость добавления к фенотипическому анализу функциональной оценки с количественной целью. SCID-восстанавливающие клетки найдены среди CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-популяции клеток, но только небольшая часть CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-клеток имеет функциональные характеристики SRC. Сравнение стволовых клеток, ответственных за восстановление популяции у NOD-SCID мышшей, с таковыми при аутологичной трансплантации у облученных павианов, свидетельствует о том, что у NOD-SCID мышшей за восстановление популяции ответственны другие ГСК и клетки-предшественники по сравнению с нечеловекообразными приматами [40]. Однако различия могут быть связаны с разным типом трансплантации (ксеногенная против аутологичной). Жизненно важную роль в способности к приживлению стволовых клеток играет хоуминг-эффект, и возможно, количество человеческих SRC, определенное с помощью NOD-SCID мышшей, было недооценено. При использовании внутривенных инъекций стволовых клеток у мышшей было продемонстрировано увеличение количества стволовых клеток при инфузии различных типов клеток [41], что, очевидно, раскрыло уникальный компартмент человеческих стволовых клеток пуповинной крови с кратковременной способностью восстанавливать популяцию клеток костного мозга у мышшей [42].

#### Стволовые клетки пуповинной крови в сравнении с другими тканевыми источниками

Все используемые исследования свидетельствуют о повышенной концентрации ранних незрелых ГСК в пуповинной крови по сравнению с костным мозгом взрослых. Однако пока нет никаких доказательств наличия истинных уникальных особенностей стволовых/клеток-предшественников пуповинной крови по сравнению с такими же клетками костного мозга. Незрелость клеток пуповинной крови со стволово-клеточным фенотипом документирована с помощью генетических исследований с использованием определения длины теломеры [43]. Исследования с мышьиными клетками, наилучшим образом приживляющимися у мышшей, наилучшим образом удовлетворяют гипотезе о том, что отдельные стволовые клетки из костного мозга взрослого, крови плода на поздних стадиях развития или крови новорожденного — все продуцируют сходные фракции лимфоидных и эритроидных клеток [44]. Эти результаты свидетельствуют скорее о более высокой концентрации более незрелых клеток, чем о наличии популяции клеток, уникальных для пуповинной крови.

Хотя примитивные клетки пуповинной крови в категории стволовых/клеток-предшественников имеют большую способность к пролиферации [8,

10], анализ кинетики клеточного цикла продемонстрировал, что при выделении из пуповинной крови сразу после рождения ребенка эти клетки находятся в очень медленном или неделяющемся состоянии [34, 45]. Это показано с помощью методики нейтрализации меченного тритием тимидина в сочетании с анализом колоний, а также путем точной цитометрии клеток с определенным фенотипом. Это резко контрастирует с относительно высоким пролиферативным показателем этих клеток в костном мозге. Клетки пуповинной крови вначале находятся в медленном или нециклическом состоянии, но они быстро отвечают на стимуляцию ростовыми факторами своей пролиферацией [8, 10, 34, 45]. Именно этот быстрый ответ на стимуляцию прямо ассоциирован с увеличенной экспансией этих клеток *ex vivo*.

#### Микроокружение и факторы самообновления

Пролиферация, самообновление, продолжительность жизни и дифференцировка ГСК и клеток-предшественников, вероятно, регулируются их микроокружением. В костном мозге взрослых микроокружение составлено из гемопоэтических и негемопоэтических стромальных клеток. В проведенных исследованиях по определению регуляторных компонентов в пределах интактной структуры микроокружения было выявлено, что остеобласты являются регуляторным компонентом ниши ГСК *in vivo* и влияют на функцию этих незрелых ГСК через активацию Notch [46] и через костный морфогенетический протеин [47]. Клетки и ростовые факторы, вовлеченные в развитие костей, были предварительно связаны с регуляцией гемопоэтических клеток-предшественников [48, 49].

Все больше доказательств существования в постнатальном периоде гемангиобласта, который дает начало и крови, и кровеносным сосудам, хотя они еще не окончательные [50–52]. Информация относительно регуляции роста подразумеваемого взрослого гемангиобласта должна также пролить свет на рост и дифференцировку ГСК.

Цитокины, хемокины и их рецепторы, действующие в одиночестве или в комбинации, осуществляют регуляцию пролиферации миелоидных клеток-предшественников [53, 54]; они осуществляют контроль клеточного цикла и, по существу, контрольных точек клеточного цикла [55]. Цитокины и внутриклеточные сигнальные молекулы, вовлеченные в пролиферацию и/или самообновление ГСК, включают следующие лиганды и их рецепторы: фактор стволовых клеток/steel-фактор/*c-kit* [56], Flt3 лиганд [56], Notch лиганды/Notch [57–63] и Wnt3a/Frizzled [64, 65]. Задействованные внутриклеточные молекулы включают: p21<sup>cip1/waf1</sup> [66], Нох В4/PBX1 [67–69], Vmi-1 [70] и мембранный белок mKirre, происходящий из стромальных клеток [71]. Представляет инте-

рес, что Nanog [72, 74], Stat3 [75, 76] и Hex [77] участвовали в росте и дифференцировке эмбриональных стволовых клеток. Возможно, что внутриклеточные молекулы, вовлеченные в регуляцию эмбриональных стволовых клеток и гемопоэтических клеток-предшественников, могут также играть роль в пролиферации и/или самообновлении ГСК. Так, Stat3 связан с регуляцией гемопоэза [78], а фосфорилирование серина в Stat3 связано с пролиферацией клеток-предшественников в ответ на комбинированную стимуляцию steel-фактором и гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (ГМ-КСФ) или интерлейкином-3 (IL-3) [79]. Экспрессия Hex ассоциирована с усилением пролиферации миелоидных клеток-предшественников [80], Stat5 является важным для Flt3 лиганда при синергичной стимуляции миелоидных предшественников [81]. Внутриклеточная сигнальная молекула SHIP вовлечена в регуляцию гемопоэтических клеток-предшественников [82] и ГСК [83].

Другие цитокины, которые могут влиять на пролиферацию стволовых клеток и/или самообновление — это тромбопоэтин, онкостатин М и IL-20. Тромбопоэтин является рано действующим цитокином [84], который вовлечен в развитие гемангиобластов [85] и служит одним из ингредиентов, наряду со steel-фактором и Flt3 лигандом, используемым исследователями для экспансии ГСК и клеток-предшественников *ex vivo* [86]. Онкостатин М — это цитокин, вырабатываемый Т-хелперами 1, который регулирует гомеостаз клеток-предшественников [87]. IL-20 — новый член семейства интерлейкинов [88, 89] — является кандидатом в группу стволово-клеточных эффекторных молекул, имеющих избирательную активность в отношении CFU-GEMM среди других миелоидных клеток-предшественников [90]. IL-20 способен увеличивать количество CFU-GEMM в костном мозге человека и мыши и в пуповинной крови человека в присутствии steel-фактора и эритропоэтина *in vitro*, тогда как не оказывает влияния на эритроидные, гранулоцитарно-макрофагальные или мегакариоцитарные предшественники. IL-20 трансгенные мыши имеют увеличенное количество CFU-GEMM, находящиеся в клеточном цикле, но не других миелоидных предшественников, а введение IL-20 нормальным мышам значительно увеличивает только количество CFU-GEMM и их клеточный цикл [90]. Это первый описанный цитокин с такой специфичностью. Так как CFU-GEMM могут быть накоплены *in vitro* при условии добавления адекватных цитокинов (steel-фактор ± плазма пуповинной крови) [31, 32], возможно, что IL-20 может также вызывать увеличение пролиферации и/или самообновления стволовых клеток. IL-20 связывается с рецепторами IL-20 (R) типа I и II [91]. IL-20R тип I состоит из субъединиц IL-20R $\alpha$  и IL-20R $\beta$ , тогда как IL-20R тип II со-

стоит из IL-20R $\beta$  субъединицы и одной субъединицы IL-22R. Хотя и IL-19, и IL-24 связываются с мышшиной Vaf3 клеточной линией, созданной с экспрессией типа I или типа II IL-20R, и стимулируют пролиферацию адекватных рецептор-содержащих клеток, они не показывают влияния на мышшиные или человеческие миелоидные клетки-предшественники [90]. Все еще не до конца известно, какой рецептор использует IL-20 и каков его механизм действия. И IL-20RI, и IL-20RII проводят внутриклеточные сигналы через Stat3 [92]. Stat3 играет существенную роль в поддержании врожденного иммунитета [78] и является сигнальным путем, вовлеченным в сигналы самообновления, индуцируемые LIF в эмбриональных стволовых клетках [75], и наряду с JAK2-путем поддерживает самообновление в эмбриональной линии стволовых клеток сперматогонии дрозофилы [76]. При поддержке второго сигнала от steel-фактор/c-kit или Flt3 лиганда/Flt3, Stat3 поддерживает самообновление первичных мультипотентных гемопоэтических клеток [92].

Самообновление требует деления клеток без потери «стволовости» и плюрипотентности, по крайней мере, у одной из дочерних клеток (ассиметричное деление клеток) [93]. Процесс, путем которого исходные клеточные детерминанты разделяются при делении клеток [94–96], зависит от поляризации и сегрегации поперек митотического веретена. Контрольные точки клеточного цикла необходимы для поддержания прогрессии событий деления клеток [97]. Были описаны некоторые из этих контрольных точек [98]. Контрольная точка сборки митотического веретена (MSAC) определяет, что клеточный цикл не будет развиваться от метафазы к анафазе, пока все парные сестринские хроматиды не выстроятся должным образом поперек метафазной пластинки. MSAC, вероятно, является критической для адекватной регуляции самообновления и дифференцировки, и в процесс могут быть вовлечены митотические белки контрольной точки.

Ингибитор циклин-зависимой киназы p21<sup>cip1/waf1</sup> вовлечен в синергичную стимуляцию steel-фактором пролиферации клеток-предшественников [99, 100] и в функционирование стволовых клеток [66]. Так как p21<sup>cip1/waf1</sup> связан с адекватным функционированием MSAC [101], MSAC может быть вовлечена в пролиферацию и/или самообновление стволовых клеток. Кроме того, так как p21<sup>cip1/waf1</sup> связан с цитокиновой синергией, а цитокиновая синергия, вероятно, влияет на функцию стволовых клеток [102], цитокины могут действовать на стволовые клетки через p21<sup>cip1/waf1</sup> и MSAC.

Вдобавок к их влиянию на рост, цитокины вовлечены в выживаемость/антиапоптоз ГСК и клеток-предшественников. Одной такой молекулой является СХС-хемокин, фактор стромально-клеточного происхождения-1 (SDF-1)/CXCL12, который сигнала-

лизирует и индуцирует активность через рецептор — CXCR4 [103, 104]. Возникло предположение, что даже манипуляции с одним генетическим элементом могут влиять на самообновление и дифференцировочный потенциал незрелых гемопоэтических клеток [105]. Если будет доказано использование любого из вышеуказанных цитокинов и/или внутриклеточных сигнальных молекул при *ex vivo* экспансии ГСК, то это может позволить более широкое применение трансплантаций пуповинной крови.

Первый банк пуповинной крови был организован в 1993 г. П. Рубинштейном в Нью-Йорке [8]. Однако одной из проблем при создании банков пуповинной крови служит неизвестный отрезок времени, в течение которого образцы пуповинной крови могут поддерживаться в криоконсервированном состоянии. Теоретически, с момента заморозки стволовые клетки и клетки-предшественники (при наличии постоянного источника жидкого азота) должны быть способны поддерживать длительный период времени, по крайней мере, в течение нормального периода жизни индивидуума. Самое длительное время хранения пуповинной крови, которая впоследствии использовалась для клинической трансплантации, вероятно, находится в диапазоне от 5 до 8 лет. Три группы исследователей описали восстановление предшественников из пуповинной крови, хранившейся замороженной 12–15 лет [32, 106, 107]. В наиболее крупном исследовании [32] было продемонстрировано, что после 15 лет хранения размороженные ядродержащие клетки, гранулоцитарно-макрофагальные (CFU-GM), эритроидные (BFU-E) и мультипотентные (CFU-GEMM) предшественники имели среднее воспроизводство ( $\pm 1$  CO) в  $83 \pm 12$ ,  $95 \pm 16$ ,  $84 \pm 25$  и  $85 \pm 25$  клеток соответственно. Отсутствие повреждения функциональных возможностей этих размороженных клеток-предшественников было выявлено экстенсивной пролиферативной способностью CFU-GM, BFU-E и CFU-GEMM, которые генерировали колонии, содержащие до 22 500, 182 500 и 292 500 клеток соответственно, после стимуляции в полутвердой целлюлозной питательной среде с эритропоэтином, ГМ-КСФ, ИЛ-3 и steel-фактором. CFU-GEMM-колонии могли быть пересажены на вторичные чашки с образованием в результате CFU-GEMM-колоний таких же по размеру, как и сформированные на первичных культуральных чашках, а CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-клетки пуповинной крови, выделенные из размороженных после 15-летнего хранения клеток, демонстрировали более чем в 250 раз большую *ex vivo* экспансию клеток-предшественников. Кроме того, CD34<sup>+</sup>-клетки, выделенные из этих разморозок, были способны приживляться у NOD-SCID мышей с частотой, эквивалентной таковой у свежесделанных CD34<sup>+</sup>-клеток пуповинной крови. Таким образом, клетки пуповинной крови могут храниться замороженными, по

крайней мере, 15 лет с вероятностью того, что они будут способны приживляться у человеческих реципиентов.

#### Моделирование биологических свойств CD133<sup>+</sup> и CD34<sup>+</sup> ГСК пуповинной крови человека

Возможность воздействовать на механизмы, регулирующие развитие стволовых клеток, открывает широчайшие перспективы применения этих клеток в разных областях медицины.

Изучение возможности моделирования влияния различных генетических агентов и прочих внешних факторов на биологические свойства стволовых клеток представляется актуальной задачей, так как в этом случае можно получить возможность влиять на степень и направленность их дифференцировки [108–110].

Трудности изучения биологических свойств стволовых клеток связаны в первую очередь с тем, что они в большей своей массе находятся вне клеточного цикла, и в таком состоянии недоступны для большинства вирусных векторов.

Таким образом, появилась задача создания нового поколения векторов, способных проникать в неделящиеся клетки. Выходом из этого положения стала генерация новой конструкции на базе вируса иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1). Было замечено, что вирус обладает способностью инфицировать практически все типы клеток, в том числе и находящиеся в покое.

К настоящему времени в распоряжении ученых появились мощные инструменты, способные коренным образом влиять на биологию клетки. К их числу следует, прежде всего, отнести векторы так называемой «третьей генерации» [111–114], способные переносить и встраивать чужеродную ДНК в геном исследуемых клеток, влияя, таким образом, на их функции.

Векторы, переносчики ДНК, полученные от лентивирусов, таких как вирус иммунодефицита человека 1-го типа, применяются при лечении некоторых заболеваний человека (болезнь Альцгеймера) благодаря их способности внедряться практически во все типы клеток независимо от их пролиферативного статуса, как *ex vivo*, так и *in vivo* [112–121].

Векторы на базе ВИЧ 1 — это не способные реплицироваться, гибридные вирусные элементы, состоящие из базовых протеинов лентивируса и имеющие оболочку другого вирусного агента, чаще всего вируса везикулярного стоматита человека (VSV) или MLV — его амфотропной оболочки [114, 118]. Применение VSV дает более устойчивый и высокий вирусный титр, что выражается в высокой стабильности вирусных частиц по сравнению с оболочками, взятыми от других вирусов.

Лентивирусы имеют сложную организацию генома. Наряду с основными структурными генами

(*gag, pol, env*), которые присущи всем ретровирусам, лентивирусы содержат 2 главных регуляторных гена (*tat* и *rev*) и несколько дополнительных генов, принимающих участие в модулировании вирусной генной экспрессии, сборке вирусных элементов, а также структурных и функциональных взаимодействиях в пораженных клетках. Репликация лентивирусов осуществляется частично путем работы *cis*-активных последовательностей ДНК, которые не кодируют протеины вируса. Большинство *cis*-активных последовательностей крайне необходимы для функционирования вируса, и они обычно всегда включаются в создаваемый вектор. Также существуют еще и *trans*-активные последовательности ДНК, которые кодируют 3 группы протеинов: структурные, регуляторные и вспомогательные [111, 115, 116, 122, 123].

Улучшение качества биологической безопасности получаемых векторов было достигнуто в результате полного удаления «ненужных» генов — *Vif, Vpr, Vpr* и *Nef* из основной конструкции при одновременном сохранении исходного титра получаемого вектора. Это привело к созданию так называемой «второй генерации» векторных систем, без снижения уровня их эффективности [115]. В настоящее время ученые имеют в своем распоряжении третье поколение векторов [111], в которых полностью отсутствуют главные регуляторные гены вируса *tat* и *rev*, что также сделано для достижения наиболее высокого уровня биологической защищенности при работе с вирусом с сохранением высокого уровня активности получаемого вектора. Эта кассета содержит гены *gag* и *pol* [124–126], а также участок, кодирующий протеин, продукт гена *rev* [127], встраиваемый отдельной, не наслаивающейся конструкцией [111]. Высокоактивные промоторы, расположенные перед сайтом старта транскрипции вектора, способны полностью заменить функцию гена *tat* [128]. Это нововведение дало возможность не только существенно повысить титр производимых векторов (около  $10^7$  TU/ml — на клетках HeLa), но и достичь еще более высокой степени биологической защиты, поскольку теперь любой способный к репликации рекомбинантный вирус, который только может быть произведен в процессе приготовления векторов, будет нуждаться во всех факторах, необходимых для достижения вирулентности и репликации ВИЧ-1 *in vivo*. Поэтому возможно утверждать, что работа с векторами на базе ВИЧ-1 стала практически абсолютно безопасной [115, 116]. К тому же существенный прогресс был достигнут в результате получения векторов, способных после переноса трансгена в клетку-мишень подвергаться самостоятельной инактивации (*self inactivating vectors* — SIN) [118, 120, 123, 129].

К другим особенностям можно отнести изменения с целью улучшения доставки трансгенов к клетке-мишени и последующей экспрессии. Одна из таких модификаций включает в себя внедрение

посттранскрипционного регуляторного элемента [130], который был выделен из генома вируса гепатита североамериканского лесного сурка (*Woodchuck posttranscriptional regulatory element* — WPRE), в 3'конец переносимого вектора. WPRE действует на уровне посттранскрипции путем стимулирования нуклеарного экспорта транскриптов и/или увеличения реакций полиаденилирования самих транскриптов, тем самым увеличивая количество общей мРНК в клетках. Способность векторов инфицировать неделящиеся и терминально дифференцированные клетки, включая нейроны, фоторецепторные клетки сетчатки, некоторые виды эпителиальных клеток, а также плюрипотентные стволовые клетки крови, делает возможным создание методов, позволяющих применить генную терапию в лечении ряда заболеваний [113].

Этот вектор имеет сайт клонирования (MCS), который позволяет удобно встроить интересующий исследователя ген в его последовательность ДНК, а затем перемещать в другие конструкции, «разрезая» интересующий участок вектора уже с соответствующими промоторами и дополнительными генами устойчивости к ампициллину (*bla*), а также *ori*. Этот вектор был выбран экспериментальным путем (изначально использовались другие векторы в качестве промежуточных), что сильно сказалось на конечном результате — при использовании других типов векторных систем переносимые гены не работали. Возможность эффективного переноса трансгена к клетке-мишени открыла новые возможности в области анализа влияния разных генов на функции ГСК.

В нашем случае исследовательский интерес представляет семейство генов *Notch*, которое известно своим активным участием в регуляции дифференцировки и развития ГСК. *Notch* был идентифицирован впервые в 1919 г., как ген, который обуславливает развитие насечек на краях крыльев мух. Как было выяснено позднее, гены семейства *Notch* играют ключевую роль в эмбриональном развитии дрозофилы и *C. elegans*. У мух ген необходим для нормального нейрогенеза, миогенеза, формации крыльев, развития тканей глаза, оогенеза и других тканей [131, 132].

Усиленное изучение работы генов этого семейства у дрозофилы показали, что ген *Notch* кодирует высоко законсервированный трансмембранный рецептор, который экспрессируется как на эмбриональных клетках, так и на клетках взрослой особи [133, 134]. Механизмы передачи сигнала каскадом *Notch* в животном мире универсальны, ему присущи все характерные свойства сигнальных систем. Белок *Notch*, который служит рецептором для *Notch*-сигнального пути, выделен как у беспозвоночных, так и у позвоночных: дрозофилы, нематоды, лягушки, рыб, грызунов, человека. Путь *Notch* через ла-

теральное ингибирование или индукцию участвует фактически во всех клеточных контактах у животных и наиболее изучен у *Drosophila melanogaster* [132].

Рецепторы *Notch* вовлечены в большое количество взаимодействий [135–137], определяющих в конечном итоге судьбу той или иной клетки или клеточной популяции в целом, что не может, естественно, не затронуть общее развитие и функцию многих органов, включая гематопоз и иммунную систему [138].

У человека известно 4 гена из этого семейства, каждый из которых имеет свой собственный рецептор. Семейство рецепторов *Notch* локализовано на хромосомах 9q34, 1p13-p11, 19p13.2-p13.1 и 6p21.3. Эти рецепторы представляются как довольно гомологичные структуры, что справедливо и для других организмов, включая человека. Все 4 рецептора экспрессируются на клетках кроветворной системы [137, 139]. *Notch 1* — преимущественно на тимоцитах, а также макрофагах и стволовых клетках. *Notch 2*-рецепторы находят на тимоцитах и В-клетках. *Notch 3* экспрессируется на всех типах клеток. Экспрессия *Notch 4* доминирует у эндотелиальных клеток, а также макрофагов. Экстрацеллюлярный домен *Notch 1–2* состоит из 36 epidermal growth factor (EGF)-подобных повторов и 3 Lin-12/*Notch*-повторов. *Notch 3–4* имеют 34 и 29 EGF-подобных повторов соответственно. Интрацеллюлярный домен рецепторов состоит из RAM-домена, шести ANK-повторов, двух последовательностей ядерной локализации (NLS) и пролин-глутамат-серин-треонин-обогащенного домена (PEST). *Notch 4* имеет более короткий домен из-за отсутствия второй NLS [139].

Как видно, функции этих рецепторов несколько перекрывают друг друга и, кроме того, они могут использовать одни и те же лиганды. Лигандами для *Notch* являются трансмембранные протеины, которые экспрессируются на соседствующих клетках. Пока их известно всего 3 — это *Delta*, *Jagged 1* и *Jagged 2*. Они расположены на хромосомах 6q27, 20p12-p11 и 14q32. На гемопоэтических клетках *Jagged 2* экспрессируется у тимоцитов, *Delta*, по данным многих исследователей, обнаруживает себя практически на всех клетках кроветворной системы, а также клетках стромы. *Jagged 1*, наоборот, скорее всего имеет ограниченную экспрессию на клетках нескольких типов, таких как клетки стромы, мегакариоциты и стволовые клетки [137]. Подлинно известно, что все 3 лиганда взаимодействуют как минимум с рецепторами генов *Notch 1* и *Notch 2*. Также известно, что лиганд *Jagged 1* взаимодействует с *Notch 3* у мышей. Активация сигнального пути для *Notch* посредством его лигандов не вызывает сомнений: в экспериментах с мышами, у которых отсутствовал лиганд *Jagged 1*, наблюдалась эмбриональная смерть, как результат дефектов сосудистого морфогенеза. Дефицит *Jagged 2* обуславливал перинаталь-

ную смертность, как результат дефектов краниофациального морфогенеза. *Delta*-дефицитные мыши также демонстрировали эмбриональную смертность. Взаимодействие рецептора с лигандом индуцирует дополнительные каскадные протеолитические реакции, заканчивающиеся перемещением интрацеллюлярного домена (активированной формы интрацеллюлярной части рецептора *Notch-ICN*) к ядру. Там ICN взаимодействует с факторами транскрипции, такими как CBF1/RBPJk, активируя тем самым CBF1-регулируемые гены, как например *Hairy* и *HES 1*. Эти гены в свою очередь регулируют экспрессию тканеспецифичных факторов транскрипции, которые влияют на линейную дифференцировку клеток (применительно к гематопозу) и некоторые другие события [137]. Во время этого процесса ICN может контактировать с дополнительными регуляторами сигнальной системы, включающими в себя так называемые позитивные регуляторы *Deltex* и *Mastermind*, или с негативным регулятором *Numb*. Точные молекулярные механизмы этих взаимодействий пока не известны. Кроме того, остаются до конца не изученными условия, при которых происходит переключение от угнетения к активации самих генов *Notch*, индуцируемое присутствием ICN [140]. Активно исследуемый в последние годы ген *Presenilin* также причисляют к участникам *Notch*-пути [141]. Список генов, имеющих отношение к *Notch*-пути, все время расширяется [142, 143]. Однако сеть взаимоотношений очень сложна, и решение вопроса о принадлежности генов к *Notch*-пути или иной цепи передачи информации — задача не из легких. Так, только часть авторов на основании данных о генетическом взаимодействии *Notch* и *Delta* и сходстве мутантных фенотипов относят к *Notch*-сигнальному пути ген *deltex* [136].

Четко известно, что *Notch 1* принимает участие в развитии и созревании Т-клеток [139]. Также он влияет на развитие CD8<sup>+</sup>- и CD4<sup>+</sup>-клеток. Кроме того, ICN способствует приобретению фенотипа CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> клетками TCR α/β при переходе их к клеткам CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>. Под его регулированием происходит CD4<sup>+</sup> Т-клеточный иммунный ответ.

На В-клеточной линии чаще экспрессируется *Notch 2*, который функционирует по-разному на разных стадиях развития этих клеток [139]. Как уже было отмечено, *Notch* угнетает функцию продукта гена *E2A*, протеина E47. *E2A* экспрессируется на всем протяжении В-клеточного развития и является очень важным фактором транскрипции на ранних стадиях дифференцировки. Потеря функции *E2A* блокирует В-клеточное развитие на про В-клеточной стадии [139].

Действие генов *Notch* на клетки миелоидной линии, по мыслям ученых, сводится к тому, что во многих случаях они ингибируют или, по крайней мере, отсрочивают их дифференцировку [137].

Кроме того (и это справедливо для всех типов гемопоэтических клеток), на разных стадиях развития различные сигналы, продуцируемые цитокинами, вносят свою лепту в регуляцию дифференцировки. Скорее всего, сигналы генов *Notch* кооперируют и/или модифицируют эффекты разных цитокинов, что в свою очередь приводит к изменениям направления развития.

При определении колониеобразующей активности CD133<sup>+</sup>-клеток пуповинной крови оказалось, что гены *Notch 1* и *2* оказывают супрессивное действие независимо от линейной принадлежности колоний, что, как правило, заканчивается их гибелью. YFP-позитивные колонии с момента их формирования до 3–4 дней выглядели вполне жизнеспособными, но затем наблюдалось достаточно резкое угасание их роста и отсутствие формирования новых колоний. Затем в течение 3–4 дней наблюдался распад и гибель колонии в целом. Колонии негативного контроля, напротив, сохраняли способность к росту еще достаточно продолжительное время — около 7–10 дней. Ген *Notch 2* оказывал большее супрессивное воздействие, чем ген *Notch 1*. Наибольший супрессивный эффект генов *Notch* отмечался в популяции клеток, дающих рост смешанных колоний, т. е. наиболее ранних предшественников гемопоэ-

за (при сравнении групп *Notch 1* против негативного контроля и *Notch 2* против негативного контроля) по сравнению с линейно-специфичными клетками-предшественниками [144].

Такая же тенденция наблюдалась при определении уровня спонтанного апоптоза CD133<sup>+</sup>-клеток. Клетки, инфицированные геном *Notch 1*, имели уровень спонтанного апоптоза  $15,78 \pm 3,27\%$ , а *Notch 2* —  $29,31 \pm 5,64\%$ . В контрольной популяции этот показатель не превышал 2% [145].

Таким образом, перспектива создания эффективного механизма для переноса генов в неделящие клетки, а также создание и отработка моделей для изучения влияния различных факторов на биологические свойства ГСК с целью возможности модификации их дальнейшей пролиферации и дифференцировки представляется актуальной задачей.

В конечном итоге большое значение имело бы точное понимание, какие клетки необходимы и в каком количестве для гарантии того, что образец пуповинной крови имеет адекватное количество долго- и кратковременно приживляющихся стволовых и клеток-предшественников. Накопление знаний относительно биологии ГСК и клеток-предшественников, без сомнения, расширит полноценность пуповинной крови для трансплантации.

## Л и т е р а т у р а

- Gluckman E., Broxmeyer H.E., Auerbach A.D. et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989;321:1174–8.
- Broxmeyer H.E., Kurtzberg J., Gluckman E. et al. Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation. *Blood Cells* 1991;17:313–29.
- Broxmeyer H.E., Gluckman E., Auerbach A. et al. Human umbilical cord blood: A clinically useful source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Int J Cell Cloning* 1990;8:76–91.
- Kohli-Kumar M., Shahidi N.T., Broxmeyer H.E. et al. Haematopoietic stem/progenitor cell transplant in Fanconi anemia using HLA-matched sibling umbilical cord blood cells. *Br J Haematol* 1993;85:419–22.
- Wagner J.E., Broxmeyer H.E., Byrd R.L. et al. Transplantation of umbilical cord blood after myeloblastic therapy: Analysis of engraftment. *Blood* 1992;79:1874–81.
- Wagner J.E., Kernan N.A., Steinbuch M. et al. Allogeneic sibling umbilical cord blood transplantation in forty-four children with malignant and non-malignant disease. *Lancet* 1995;346:214–9.
- Broxmeyer H.E. Role of cytokines in hematopoiesis. In: Oppenheim J.J., Rossio J.L., Gearing A.J.H., eds. *Clinical aspects of cytokines: Role in pathogenesis, diagnosis and therapy*. New York: Oxford University Press, 1993:201–6.
- Broxmeyer H.E., Hangoc G., Cooper S. et al. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation of adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4109–13.
- Krause D.S., Fackler M.J., Civin C.L., May W.S. CD34: Structure, biology and clinical utility. *Blood* 1996;87:1–13.
- Lu L., Xiao M., Shen R.N. et al. Enrichment, characterization and responsiveness of single primitive CD34<sup>+++</sup> human umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells with high proliferative and replating potential. *Blood* 1993;81:41–8.
- Broxmeyer H.E., Cooper S., Li Z.H. et al. Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor, a ligand for the tyrosine kinase receptor Flk-1. *Int J Hematol* 1995;62:203–15.
- Hao Q.L., Shah A.J., Thiemann F.T. et al. A functional comparison of CD34<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> cells in cord blood and bone marrow. *Blood* 1995;86:3745–53.
- Mayani H., Lansdorp P.M. Thy-1 expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood. *Blood* 1994;83:2410–7.
- Laver J.H., Abboud M.R., Kawashima I. et al. Characterization of c-kit expression by primitive hematopoietic progenitors in umbilical cord blood. *Exp Hematol* 1993;23:1515–9.
- Rappold I., Ziegler B.L., Kohler I. et al. Functional and phenotypic characterization of cord blood and bone marrow subsets expressing Flt3 (CD 135) receptor tyrosine kinase. *Blood* 1997;90:111–25.
- Broxmeyer H.E., Lu L., Cooper S. et al. Flt-3-ligand stimulates/co-stimulates the growth of myeloid stem/progenitor cells. *Exp Hematol* 1995;23:1121–9.
- Traycoff C.M., Abboud M.R., Laver J. et al. Evaluation of the in vitro behavior of phenotypically defined populations of umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 1994;22:215–22.
- Cicuttini F.M., Welch K.L., Boyd A.W. The effect of cytokines on CD34<sup>+</sup> Rh-123 high and low progenitor cells from human umbilical cord blood. *Exp Hematol* 1994;22:1244–51.
- Osawa M., Hanada K., Hamada H., Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic re-constitution by a single CD34<sup>+</sup>/low<sup>+</sup> negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996;273:242–5.
- Bhatia M., Bonnet D., Murdoch B. et al. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med* 1998;4:1038–45.
- Zanjani E.D., Almeida-Porada G., Livingston A.G. et al. Human bone marrow CD34 cells engraft in vivo and undergo multilineage expression including giving rise to

- CD34<sup>+</sup> cells. *Exp Hematol* 1998;26:353–60.
22. Sato T., Laver J.H., Ogawa M. Reversible expression of CD34 by murine hemato-poietic stem cells. *Blood* 1999;94:2548–54.
23. Ruggieri L., Heimfeld S., Broxmeyer H.E. Cytokine-dependent ex vivo expansion of early subsets of CD34<sup>+</sup> cord blood myeloid progenitors is enhanced by cord blood plasma, but expansion of the more mature subsets of progenitors is favored. *Blood Cells* 1994;120:436–54.
24. Traycoff C.M., Abboud M.R., Laver J. et al. Human umbilical cord blood hemato-poietic progenitor cells: Are they the same as their adult bone marrow counterparts? *Blood Cells* 1994;20:382–91.
25. Hao Q.L., Zhu J., Price M.A. et al. Identification of a novel, human multilymphoid progenitor in cord blood. *Blood* 2001;97:3683–90.
26. Phillips R.L., Ernst R.E., Brunk B. et al. The genetic program of hematopoietic stem cells. *Science* 2000;288:1635–40.
27. Ramalho-Santos M., Yoon S., Matsuzaki Y. et al. Sternness: Transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* 2002;298:597–600.
28. Ivanova N.B., Dimos J.T., Schaniel C. et al. A stem cell molecular signature. *Science* 2002;298:601–4.
29. Cooper S., Broxmeyer H.E. Clonogenic methods in vitro for the enumeration of granulocyte-macrophage progenitor cells (CFU-GM) in human bone marrow and mouse bone marrow and spleen. *J Tissue Culture Methods* 1991;3:77–82.
30. Cooper S., Broxmeyer H.E. Measurement of interleukin-3 and other hematopoietic growth factors, such as GM-CSF, G-CSF, M-CSF, erythropoietin and the potent costimulating cytokines steel factor and Flt-3 ligand. In: Coligan J.E., Kruisbeek A.M., Margulies D.H. et al. (eds). *Current protocols in immunology*. Vol 1, Suppe 18. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1996:6.4.1–6.4.20.
31. Carow C.E., Hangoc G., Broxmeyer H.E. Human multipotential progenitor cells (CFU-GEMM) have extensive replating capacity for secondary CFU-GEMM: An effect enhanced by cord blood plasma. *Blood* 1993;81:942–9.
32. Broxmeyer H.E., Srouf E.F., Hangoc G. et al. High efficiency recovery of hemato-poietic progenitor cells with extensive proliferative and ex vivo expansion activity and of hematopoietic stem cells with NOD/SCID mouse repopulation ability from human cord blood stored frozen for 15 years. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;00:645–50.
33. Xiao M., Broxmeyer H.E., Horie M. et al. Extensive proliferative capacity of single isolated CD34<sup>+</sup> human cord blood cells in suspension culture. *Blood Cells* 1994;20:455–67.
34. Moore M.A.S., Hopkins I. Ex vivo expansions of cord blood derived stem cells and progenitors. *Blood Cells* 1994;20:468–81.
35. Piacibello W., Sanavio F., Garretto L. et al. Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. *Blood* 1997;89:2644–53.
36. Lu L., Ge Y., Li Z.H. et al. CD34<sup>+</sup> stem/progenitor cells purified from cryopreserved normal cord blood can be transduced with high efficiency by a retroviral vector and expanded ex vivo with stable integration and expression of Fanconi anemia complementation C gene. *Cell Transplant* 1995;4:493–503.
37. Bhatia M., Wang J.C.Y., Kapp U. et al. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immunodeficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:5320–5.
38. Hogan C.J., Shpall E.J., McNulty O. et al. Engraftment and development of human CD34(+) enriched cells from umbilical cord blood in NOD/LtSz-scid/scid mice. *Blood* 1997;90:85–96.
39. Wang J.C.Y., Doedens M., Dick J.E. Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay. *Blood* 1997;89:3919–24.
40. Horn P.A., Thomasson B.M., Wood B.L. et al. Distinct hematopoietic stem/progenitor cell populations are responsible for repopulating NOD/SCID mice compared with nonhuman primates. *Blood* 2003;102:4329–35.
41. Yahata T., Ando K., Sato T. et al. A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow. *Blood* 2003;101:2905–13.
42. Mazurier F., Doedens M., Gan O.I. et al. Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells. *Nat Med* 2003;9:959–63.
43. Vaziri H., Dragowska W., Allsopp R.C. et al. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: Loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9857–60.
44. Harrison D.E., Astle C.M. Short- and long-term multilineage repopulating hematopoietic stem cells in late fetal and newborn mice: Models for human umbilical cord blood. *Blood* 1997;90:174–81.
45. Movassagh M., Caillot L., Baillou C. et al. Optimization of the cycling of clonogenic and primitive cord blood progenitors by various growth factors. *Stem Cells* 1997;15:214–22.
46. Calvi L.M., Adams G.B., Weibrecht K.W. et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003;425:841–6.
47. Zhang J., Niu C., Ye L. et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003;425:836–41.
48. Bellido T., Jilka R.L., Boyce B.F. et al. Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgens: The role of the androgen receptor. *J Clin Invest* 1995;95:2886–95.
49. Jilka R.L., Passeri G., Girasole G. et al. Estrogen loss causes an upregulation of several hematopoietic bone marrow progenitors in the mouse: A mediating role of interleukin-6. *Exp Hematol* 1995;25:500–6.
50. Temple S. Embryonic stem cell self-renewal, analyzed. *Cell* 2003;15:247–53.
51. Kyba M., Daley G.Q. Hematopoiesis from embryonic stem cells: Lessons from and for ontogeny. *Exp Hematol* 2003;31:994–1006.
52. Bailey A.S., Fleming W.H. Converging roads: Evidence for an adult hemangioblast. *Exp Hematol* 2003;31:987–93.
53. Broxmeyer H.E. Regulation of hematopoiesis by chemokine family members. *J Hematol* 2001;74:9–17.
54. Bagby G.C. Jr, Henrich M. Growth factors, cytokines and the control of hematopoiesis. In: Hoffman R., Shattil S., Furie B. et al. (eds). *Hematology: Basic principles and practice*, 3rd ed. New York: Churchill Livingstone, 1999:154–201.
55. Mantel C.R., Gelfanov V.M., Kim Y.J. et al. P21waf-1-Chk1 pathway monitors G1 phase microtubule integrity and is crucial for restriction point transition. *Cell Cycle* 2002;1(5):327–36.
56. Lyman S.D., Jacobsen S.E.W. C-kit ligand and Flt3 ligand: Stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 1998;91:1101–34.
57. Li L., Milner L.A., Deng Y. et al. The human homolog of Rat Jagged 1 expressed by marrow stroma inhibits differentiation of 32D cells through interaction with notch 1. *Immunity* 1998;8:43–55.
58. Milner L.A., Bigas A. Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: Evidence and speculation. *Blood* 1999;93:2431–48.
59. Varnum-Finney B., Wu L., Yu M. et al. Immobilization of Notch ligand, Delta-1, is required for induction of Notch signaling. *J Cell Sci* 2000;113:4313–18.
60. Karanu F.N., Murdoch B., Miyabayashi T. et al. Human homologues of Delta-1 and Delta-4 function as mitogenic regulators of primitive human hematopoietic cells. *Blood* 2001;97:1960–7.
61. Kojika S., Griffin J.D. Notch receptors and hematopoiesis. *Exp Hematol* 2001;29:1041–52.
62. Maillard I., He Y., Pear W.S. From the yolk sac to the spleen: New roles for notch in regulating hematopoiesis. *Immunity* 2003;18:587–9.
63. Kumano K., Chiba S., Kunisata A. et al. Notch1 but not notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells. *Immunity* 2003;18:699–711.
64. Reya T., Duncan A.W., Allies L. et al. A role for Wnt signaling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 2003;423:409–14.
65. Willert K., Brown J.D., Danenberg E. et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 2003;423:448–52.
66. Stier S., Cheng T., Forkert R. et al. Ex vivo targeting of p21Cip1/Waf1 permits relative expansion of human hematopoietic stem cells. *Blood* 2003;102:1260–6.
67. Buske C., Feuring-Buske M., Abramovich C. et al. Deregulated expression of HOXB4 enhances the primitive growth activity of human hematopoietic cells. *Blood* 2002;100:862–8.
68. Krosi J., Austin P., Beslu N. et al. In vitro expansion of hematopoietic stem cells by re-combinant TAT-HOXB4 protein. *Nat Med* 2003;9:1428–32.

69. Amsellem S., Pflumio F., Bardinet D. et al. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. *Nat Med* 2003;9:1423–7.
70. Lessard J., Sauvageau G. Brmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukemic stem cells. *Nature* 2003;423:255–60.
71. Ueno H., Sakita-Ishikawa M., Morikawa Y. et al. A stromal cell-derived membrane protein that supports hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 2003;4:457–63.
72. Mitsui K., Tokuzawa Y., Itoh H. et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003;13:631–42.
73. Chambers I., Colby D., Robertson M. et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003;13:643–55.
74. Cavaleri F., Scholer H.R. Nanog: A new recruit to the embryonic stem cell orchestra. *Cell* 2003;13:551–7.
75. Raz R., Lee C.K., Cannizzaro L.A. et al. Essential role of Stat3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2846–51.
76. Kiger A.A., Jones D.L., Schulz C. et al. Stem cell self-renewal specified by Jak-Stat activation in response to a support cell cue. *Science* 2001;294:2542–5.
77. Guo Y., Chan R., Ramsey H. et al. The homeoprotein Hex is required for heman-gioblast differentiation. *Blood* 2003;102:2428–35.
78. Welte T., Zhang S.S.M., Wang T. et al. Stat3 deletion during hematopoiesis causes Crohn's disease-like pathogenesis and lethality: A critical role of Stat3 in innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:1879–84.
79. Gotoh A., Takahira H., Mantel C. et al. Steel factor induces serine phosphorylation of Stat3 in human growth factor-dependent myeloid cell lines. *Blood* 1996;88:138–45.
80. Mack D.L., Leibowitz D.S., Cooper S. et al. Down-regulation of the myeloid homeobox protein Hex is essential for normal T-cell development. *Immunology* 2002;107:444–51.
81. Zhang S., Fukuda S., Lee Y.H. et al. Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat)5a but not Stat5B for Flt3-dependent signaling. *J Exp Med* 2000;192:719–28.
82. Kim C.H., Hangoc G., Cooper S. et al. Altered responsiveness to chemokines due to targeted disruption of SHIP. *J Clin Invest* 1999;104:1751–9.
83. Helgason C.D., Antonchuk J., Bodner C., Humphries R.K. Homeostasis and regeneration of the hematopoietic stem cell pool are altered in SHIP-deficient mice. *Blood* 2003;102:3541–7.
84. Carver-Moore K., Broxmeyer H.E., Luoh S.M. et al. Low levels of erythroid and myeloid progenitors in TPO and *c-mpl-deficient mice*. *Blood* 1996;88:803–8.
85. Perlingeiro R.C.R., Kyba M., Bodie S. et al. A role for thrombopoietin in hemangioblast development. *Stem Cells* 2003;21:272–80.
86. Lewis I.D., Almeida-Porada G., Du J. et al. Umbilical cord blood cells capable of engrafting in primary, secondary, and tertiary xenogeneic hosts are preserved after ex vivo culture in a noncontact system. *Blood* 2001;97:3441–9.
87. Broxmeyer H.E., Bruns H., Zhang S. et al. Th1 cells regulate hematopoietic progenitor cell homeostasis by production of oncostatin M. *Immunity* 2002;16:815–25.
88. Blumberg H., Conklin D., Xu W. et al. Interleukin 20: Discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell* 2001;104:9–19.
89. Rich B.E., Kupper T.S. Cytokines: IL-20 — a new effector in skin inflammation. *Curr Biol* 2001;11(13):531–4.
90. Liu L., Zeng W., Ding C. et al. Selective enhancement of multipotential hematopoietic progenitors in vitro and in vivo by IL-20. *Blood* 2003;102:3206–9.
91. Dumoutier L., Leemans C., Lejeune D. et al. Cutting edge: Stat activation by I L-19, IL-20 and mda-7 through IL-20 receptor complexes of two types. *J Immunol* 2001;167:3545–9.
92. Zhao S., Zoller K., Masuko M. et al. Jak2, complemented by a second signal from c-kit or flt3, triggers extensive self-renewal of primary multipotential hematopoietic cells. *EMBO J* 2002;21:2159–67.
93. Bums C.E., Zon L.I. Portrait of a stem cell. *Dev Cell* 2002;3:612–3.
94. Momson S.J., Shah N.M., Anderson D.J. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 1997;88:287–98.
95. Jan Y.N., Jan L.Y. Asymmetric cell division. *Nature* 1998;392:775–9.
96. Brummendorf T.H., Dragowska W., Zijimans J.M. et al. Asymmetric cell divisions sustain long-term hematopoiesis from single-sorted human fetal liver cells. *J Exp Med* 1998;188:1117–24.
97. Hartwell L., Weinert T. Checkpoints: Controls that control the order of cell cycle events. *Science* 1989;246:629–34.
98. Murray A. Cell cycle checkpoints. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6:872–6.
99. Mantel C., Luo Z., Canfield J. et al. Involvement of p21<sup>kip-1</sup> and p27<sup>kip-1</sup> in the molecular mechanisms of steel factor induced proliferative synergy in vitro and of p21<sup>kip-1</sup> in the maintenance of stem/progenitor cells in vivo. *Blood* 1996;88:3710–9.
100. Braun S.E., Mantel C., Rosenthal M. et al. A positive effect of p21<sup>kip-1/waf-1</sup> in the colony formation from murine myeloid progenitor cells as assessed by retroviral-mediated gene transfer. *Blood Cells Mol Dis* 1998;24:138–48.
101. Mantel C., Braun S.E., Reid S. et al. p21(cip-1/waf-1) deficiency causes deformed nuclear architecture, centriole overduplication, polyploidy, and relaxed microtubule damage checkpoints in human hematopoietic cells. *Blood* 1999;93:1390–8.
102. Mantel C., Hendrie P., Broxmeyer H.E. Steel factor regulates cell cycle asymmetry. *Stem Cells* 2001;19:483–91.
103. Broxmeyer H.E., Kohli L., Kim C.H. et al. Stromal cell derived factor-1/CXCL 12 enhances survival/anti-apoptosis of hematopoietic stem and myeloid progenitor cells: Direct effects mediated through CXCR4 and Gai proteins. *J Leuk Biol* 2003;73:630–8.
104. Lee Y., Gotoh A., Kwon H.J. et al. Enhancement of intracellular signaling associated with hematopoietic progenitor cell survival in response to SDF-1/CXCL12 in synergy with other cytokines. *Blood* 2002;99:4307–17.
105. Mulloy J.C., Cammenga J., Berguido F.J. et al. Maintaining the self-renewal and differentiation potential of human CD34<sup>+</sup> hematopoietic cells using a single genetic element. *Blood* 2003;102:4369–76.
106. Kobylka P., Ivanyi P., Breur-Vriesendorf B. Preservation of immunological and colony-forming capacities of long-term (15 years) cryopreserved cord blood cells. *Transplantation* 1998;65:1275–8.
107. Mugishima H., Harada K., Chin M. et al. Effects of long-term cryopreservation on hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant* 1999;23:395–6.
108. Medcalf D. The molecular control of cell division, differentiation, commitment and maturation in hematopoietic cells. *Nature* 1989;399:27–30.
109. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993;81:2844–53.
110. Varnum-Finney B., Pulton M.E., Yu M. et al. The Notch ligand, Jagged 1, influences the development of primitive hematopoietic precursors cells. *Blood* 1998;91:4084.
111. Dull T., ZuJerey R., Kelly M., Mandel R.J., Nguyen M., Trono D. and Naldini L. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 1998;72:8463–71.
112. Marino M.P., Luce M.J., Reiser J. Small-to large-scale production of lentivirus vectors. *Methods in Molecular Biology*, vol.229: Lentivirus Gene Engineering Protocols. Edited by M. Federico, Humana Press Inc., Totowa, NJ 2002:43–50.
113. Sutton R.E. Production of Lentiviral Vector Supernatants and Transduction of Cellular Targets. *Methods in Molecular Biology*, vol.229: Lentivirus Gene Engineering Protocols. Edited by M. Federico, Humana Press Inc., Totowa, NJ 2002:147–58.
114. Sutton R.E., Henry T., Wu M., Rigg R., Bohnlein E. and Brown P.O. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vectors Efficiently Transduce Human Hematopoietic Stem Cells. *Journal of Virology* 1998;72(7):5781–8.
115. Antonia Follenzi and Luigi Naldini Generation of HIV-1 derived lentiviral vectors. 2002 Academic press:454–6.
116. Finer M.H., Dull T.J., Quin L., Farson D. and Roberts M.R. Kat: a high efficiency retroviral transduction system for primary human T lymphocytes. *Blood* 1994;83:43–50.
117. Hawley R.G., Covarrubias L., Hawley T. and Mintz B. Handicapped retroviral vectors efficiently transduce foreign genes into hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad. Sci USA* 1987;84:2406–10.
118. Zufferey R., Dull T., Mandel R.J., Bukovsky A. et al. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *Journal of virology* 1998;72(12):9873–80.
119. Yee K., Moores C., Jolly D.J., Wolff J.A., Respress J.G. and Friedmann T. Gene

- expression from transcriptionally disabled retroviral vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:5197–5201.
120. Yu S.F., von Ruden T., Kantoff P.W., Graber C., Sciberg M., Ruther U., Anderson W. F. and Gilboa E.. Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:3194–8.
121. Zufferey R., Nagy D., Mandel R.J., Naldini L. and Trono D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 1997;15:871–5.
122. Ingham P.W. Hedgehog signaling: a tale of two lipids. *Science* 2001;294:1879–81.
123. Hwang J.J., Li L., Anderson W.F. A conditional self-inactivating retrovirus vector that uses a tetracycline-responsive expression system. *J Virol* 1997;71:7128–31.
124. Cullen B.R., Lomedico P.T. and Ju G. Transcriptional interference in avian retroviruses — implications for the promoter insertion model of leukaemogenesis. *Nature* 1984;307:241–5.
125. Dougherty J.P., Temin H.M. A promoterless retroviral vector indicates that there are sequences in U3 required for 3' RNA processing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:1197–201.
126. Kafri T., Blomer U., Peterson D.A., Gage F.H., Verma M. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lenti viral vectors. *Nat Genet* 1997;17:314–7.
127. Olson P., Temin H.M., Dornburg R. Unusually high frequency of reconstitution of long terminal repeats in U3-minus retrovirus vectors by DNA recombination or gene conversion. *J Virol* 1992;66:1336–43.
128. Michael N.L., D'Arcy L., Ehrenberg P.K. and Redfield R.K. Naturally occurring genotypes of human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat display a wide range of basal and Tat-induced activities. *J Virol* 1994;68:3163–74.
129. Olson P., Nelson S., Dornburg R. Improved self-inactivating retroviral vector derived from spleen necrosis virus. *J Virol* 1994;68:7060–6.
130. Zufferey R., Nagy D., Mandel R.J., Naldini L. and Trono D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 1997;15:871–5.
131. Arias A.M. New alleles of Notch draw a blueprint for multifunctionality. *Trends in Genet* 2002;18:168–70.
132. Baonza A., Freeman M. Notch signaling and the initiation of neural development in the *Drosophila* eye. *Development* 2001;128:3889–98.
133. Barolo S., Stone T., Bang A.G., Posakony J.W. Default repression and Notch signaling: Hairless acts as an adaptor to recruit the corepressors Groucho and dCtBP to Suppressor of Hairless. *Genes Dev* 2002;15:1964–76.
134. Klein T., Seugnet L., Haenlin M., Arias A.M. Two different activities of Suppressor of Hairless during wing development in *Drosophila*. *Development* 2000;127:3553–66.
135. Artavanis-Tsakonas S., Matsuno K., Fortiny M.E. Notch signalling II. *Science* 1995;268:225–32.
136. Diederich R.J., Matsuno K., Hing H., Artavanis-Tsakonas S. Cytosolic interection between deltex and Notch ankyrin repeats implicates deltex in the signalling pathway. *Development* 1994;120:473–81.
137. Satoru Kojika, James D. Griffin. Notch receptors and hematopoiesis. *Experimental Hematology* 2001;29(Issue 9):1041–52.
138. Wu L., Aster J., Griffin J.D. Notch receptor signal transduction. *Experimental Hematology* 2000;28(Issue 7), Supplement 1:92.
139. Singh N., Phillips R.A., Iscove N.N. and Egan S.E. Expression of notch receptors, notch ligands, and fringe genes in hematopoiesis *Experimental Hematology* 2000;28(Issue 5):527–34.
140. Lawrence N., Klein T., Brennan K., Arias A.M. Structural requirements for Notch signalling with Delta and Serrate during the development and patterning of the wing disc of *Drosophila*. *Development* 2000;127:3185–95.
141. Struhl G., Greenwald I. Presenilin mediated transmembrane cleavage is required for Notch signal transduction in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:229–34.
142. Cadigan K.M., Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 1997;11:3286–305.
143. Doherty D., Feger G., Younger-Shepherd S., Jan L.Y., Jan Y.N. Delta is a ventral to dorsal signal complementary to Serrate, another Notch ligand, in *Drosophila* wing formation. *Genes Dev* 1996;10:421–34.
144. Ипатов С.Е., Румянцев С.А., Sutton R.E., Румянцев А.Г. Создание генных векторов на базе вируса иммунодефицита человека типа I для работы со стволовыми гемопоэтическими клетками человека. *Вопр гематол/онкол и иммунопатол в пед* 2005;4(2):92–7.
145. Ипатов С.Е., Румянцев С.А., Sutton R.E., Румянцев А.Г. Способность  $Cd133^+Cd34^-$  и  $CD133^+Cd34^+$  клеток пуповинной крови человека обеспечивать донорский гемопоэз у NOD/SCID мышей. *Вопр гематол/онкол и иммунопатол в пед* 2005;4(2):97–102.