Содержание

[1. Терапия стволовыми клетками](#_Toc281092457)

[2. Типы стволовых клеток](#_Toc281092458)

[2.1 Эмбриональные стволовые клетки](#_Toc281092459)

[2.2 Гемопоэтические стволовые клетки](#_Toc281092460)

[2.3 Мезенхимальные стволовые клетки](#_Toc281092461)

[2.4 Стромальные стволовые клетки](#_Toc281092462)

[2.5 Тканеспецифичные стволовые клетки](#_Toc281092463)

[3. Ангиогенные стволовые клетки](#_Toc281092464)

[4. Рекрутирование (мобилизация) стволовых клеток](#_Toc281092465)

[5. Пролиферация стволовых клеток](#_Toc281092466)

[6. Хоуминг стволовых клеток](#_Toc281092467)

[7. Маркеры стволовых клеток](#_Toc281092468)

[8. Болезни стволовых клеток](#_Toc281092469)

[9. Модели для изучения человеческих стволовых клеток](#_Toc281092470)

[10. Иммунология стволовых клеток](#_Toc281092471)

[11. Генетика стволовых клеток](#_Toc281092472)

[11.1.Ремоделирование хроматина](#_Toc281092473)

[11.2 Самообновление стволовых клеток](#_Toc281092474)

[11.3 Дифференцировка стволовых клеток](#_Toc281092475)

[11.4 Фармакогеномика](#_Toc281092476)

[11.5 Ассимитричное деление стволовых клеток](#_Toc281092477)

[11.6 Генная терапия и стволовые клетки](#_Toc281092478)

# 1. Терапия стволовыми клетками

Целью регенеративной медицины является восстановление формы и функции поврежденных тканей. Один из потенциальных терапевтических подходов включает использование аутологичных клеток, полученных из костного мозга. Прогресс в трансплантации ядер, образование экспериментальных гетерокариотических клеток и наблюдаемая пластичность экспрессии генов и фенотипа у различных типов свидетельствует о пластичности ядра. Последние исследования дополнили эти открытия и показали, что эндогенные клетки в костном мозге обладают способностью включаться в дефектные ткани и репрограммироваться. Независимо от механизма потенциал для новой экспрессии генов в клетках из костного мозга в тканях - реципиентах обещает развитие клеточной терапии, как в пролиферирующих, так и в пост - митотических тканях /44/.

Стволовые клетки, представляющие наибольший интерес с точки зрения их применения в медицине, - это эмбриональные, гемопоэтические и мезенхимальные. Стволовые клетки - это недифференцированные клетки, способные как к самоподдержанию, так и к дифференцировке в зрелые специализированные клетки. По типу происхождения различают эмбриональные и соматические стволовые клетки. Первые могут неограниченно поддерживаться в культуре и способны к дифференцировке во все клетки взрослого организма. Вторые обладают ограниченной способностью к дифференцировке и, возможно, ограниченным пролиферативным потенциалом. Важным для терапевтического применения, хотя и оспариваемым рядом ученых, свойством является пластичность соматических стволовых клеток, т.е. способность к контекст-зависимой дифференцировке в “неродственные” типы клеток. Предполагается, что дифференцировка большинства типов стволовых клеток происходит по принципу поэтапного иерархического созревания через промежуточные интенсивно пролиферирующие клетки - предшественники. Применение стволовых клеток в медицине находится в основном на стадии преклинических исследований. Несмотря на перспективность эмбриональных стволовых клеток, ряд обстоятельств серьезно ограничивает их терапевтическое применение в ближайшем будущем. В то же время подходы, связанные с аутотрансплантацией гемопоэтических или мезенхимальных стволовых клеток, уже начинают успешно использоваться в клинических испытаниях для лечения ишемии конечностей и последствий инфаркта миокарда. Очевидно, что применение стволовых клеток в медицине обещает кардинальный прогресс в лечении множества тяжелых заболеваний /41/.

Таким образом, основное свойство стволовых клеток - дифференцироваться в другие типы клеток широко используется в регенеративной медицине. Различные типы стволовых клеток обладают различной пластичностью, т.е. способностью перепрограммироваться в тканях - реципиентах.

# 2. Типы стволовых клеток

# 2.1 Эмбриональные стволовые клетки

Изучение эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) началось в 1963 году, первоначально с использованием дезагрегированных эмбрионов кроликов и мышей. Их дифференцировка in vitro была довольно ограниченной и обычно сводилась к образованию трофектодермных клеток, которые прикреплялись к пластику. Клетки кроличьей морулы и бластомеры прилипали более быстро, трофектодерма образовывала слой клеток, которые покрывались стволовыми клетками из внутренней части клеточной массы. Культуры бластомеров на покрытой коллагеном поверхности образовывали разнообразные клетки, включая нервные, клетки крови, нервные, фагоциты и многие другие типы клеток. Когда внутренняя клеточная масса была освобождена и культивировалась интактной или в виде клеточных дезагрегантов, были установлены линии ЭСК, которые обладали хорошими уровнями дезагрегации и большой стабильностью в секреции энзимов, морфологии и полнотой хромосом. Способности к развитию единичной мышиной эмбриональной клетки измерялись с помощью инъекции одной или более в бластоцисту реципиента, и степень колонизации в образовавшихся химерах являлась мерой их плюрипотентности. У мышей клеточные разрастания назвали эмбриональными телами, которые давали разрастания, сходные с таковыми у кроликов. Входящие в их состав клетки широко дифференцировались, в зависимости от подверженности их влиянию различных цитокинов или субстратов. Были установлены маркеры для дифференциации или плюрипотентности, что выявило, как нервные, кардиальные, гематологические и другие линии ЭСК могут быть определены in vitro. Это оказалось полезным в изучении ранней дифференцировки и использовании эти клеток при пересадке больным пациентам. Демонстрирующие сходные свойства человеческие ЭСК “всплыли” в конце 1990-ых. Модели для клинического использования ЭСК показали, как они быстро двигаются к тканям - мишеням по эмбриональным путям, дифференцируются и колонизируют орган - мишень. Никаких признаков воспаления или повреждения тканей не было обнаружено; поврежденные ткани могли быть восстановлены, включая ремиелинацию, и не образовывалось никаких опухолей. Эмбриональные стволовые клетки имеют широкий терапевтический потенциал для человека, хотя обширные клинические исследования все еще ждут своего выполнения /15/.

Современное развитие исследований стволовых клеток указывает на огромный потенциал их, как источника тканей для регенеративных терапий. Успех этих приложений будет зависеть от точных свойств и потенциалов стволовых клеток, изолированных либо из эмбриональных, либо из взрослых тканей. ЭСК, выделенные из внутренней массы ранних мышиных эмбрионов, характеризуются почти неограниченной пролиферацией и способностью дифференцироваться в дериваты по существу всех линий. Недавние изоляции и культивирование человеческих ЭСК представило новые возможности для реконструктивной медицины. Однако остаются важные проблемы. Первое, получение дериватов человеческих эмбриональных клеток из бластомеров, полученных при оплодотворении яйцеклетки in vitro создает этические проблемы, и второе, современные техники для прямой дифференциации в популяции соматических клеток не позволяют получать чистые продукты и к тому же обладают способностью образовывать опухоли. Последние исследования показали также неожиданно высокий потенциал развития взрослых тканеспецифичных стволовых клеток. Здесь также остается много вопросов, касающихся природы и статуса взрослых стволовых клеток как in vivo, так и in vitro и их способности к пролиферации и к дифференцировке/ трансдифференцировке /13/.

Имея в виду все время увеличивающуюся потребность в человеческих стволовых клетках для трансплантации, было проведено исследование in vitro и in vivo человеческих эмбриональных клеток из костного мозга/ прогениторных клеток, полученных в результате прерывания беременности 16-20 недель. При использовании приматов, как модели, было показано, что эмбриональные ткани имеют определенные свойства, которые являются оптимальными для трансплантации. Было проведено тестирование и сравнение фенотипических и функциональных характеристики эмбрионального костного мозга (ЭКМ), взрослого костного мозга (ВКМ), пуповинной крови (ПК) и периферической крови (ПЕРК) - источников наиболее примитивных стволовых клеток/прогениторных клеток. Поразительные онтогенетические различия в пропорции CD34+ клеток в ЭКМ, ВКМ, ПЕРК и ПК были обнаружены. Клоногенный потенциал, судя по результатам CFU-c исследования, был выше всего у ЭКМ по сравнению с ВКМ, ПЕРК и ПК. Более того, наблюдался существенный спад пролиферативного ответа в смешанной лимфоцитарной реакции ЭМК и ПК по сравнению с ВКМ и ПЕРК. Цитокинетические профили клеток из четырех источников были также проанализированы. Это исследование выявило, что как ВМК, так и ЭМК имеют более высокую пропорцию клеток в S-фазе по сравнению с ПЕРК и ПК клетками. ЭМК и ВМК также показали более высокую пропорцию клеток в G (2) - M фазе по сравнению с ПЕРК и ПК. Эти данные показали, что ЭМК имеют наибольшее число пролиферирующих клеток. Были изучены онтогенетические различия в стромальных клетках, полученных из ЭМК, ВМК и ПК, с особым вниманием к экспрессии определенных цитокинов, таких, как CSF, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IL-3, IL-6, IL-10 and IL-11. ЭМК показали наивысший уровень экспрессии CSF, IL-6 и IL-11 по сравнению с другими источниками. Эти цитокины могут играть важную роль в приживлении трансплантанта и хоуминге стволовых клеток. Уровни экспрессии остальных цитокинов были сходны со всеми другими источниками стромальных клеток, за исключением G-CSF, который не определялся в ПК. Более того, число колоний ЭМК и ВМК клеток было выше при инокуляции с эмбриональными стволовыми клетками. Эти результаты заставляют предположить важную регуляторную роль цитокинов в онтогенезе гематопоэза. Проделанные наблюдения указывают, что каждый источник гематопоэтических стволовых клеток имеет различные внутренние свойства, тесно коррелирующие с онтогенетическим возрастом, который является ведущий детерминантой для фенотипических характеристик, определения линии дифференцировки, иммуногенности, как и пролиферативного потенциала. Эти данные ясно показывают, что ЭМК являются лучшим источником стволовых клеток для трансплантации и терапевтической реконституции из-за очень высокой пролиферативной способности, низкой иммуногенности и наиболее высокого числа примитивных стволовых клеток/прогениторных клеток /36/.

Эмбриональные ткани являются богатейшим источником изначальных стволовых клеток и имеют несколько свойств, которые делают их особенно полезными при пересадке. Они являются превосходящими взрослые (зрелые) ткани в определенных отношениях. Первое, эмбриональные клетки способны пролиферировать быстрее и более часто, чем зрелые, полностью дифференцированные клетки. Это означает, что эти донорские клетки способны быстро восстанавливать потерянную функцию хозяина. Дополнительно, эти эмбриональные клетки могут дифференцироваться в ответ на сигналы окружающей их среды. Из-за их локализации они могут расти, удлиняться, мигрировать и устанавливать функциональные связи с другими клетками вокруг них в организме хозяина. Было обнаружено, что эти эмбриональные ткани не так легко отторгаются реципиентом из-за низкого уровня антигенов гистосовместимости в эмбриональных тканях. В то же время в них имеются ангиогенные и трофические факторы в высоких концентрациях, что увеличивает их способность расти при трансплантации. Поскольку в ранних эмбриональных гематопоэтических тканях отсутствуют лимфоциты, реакции трансплантант против хозяина минимизированы. Эмбриональные клетки имеют тенденции переживать иссечение, рассечение и пересадку лучше, поскольку у них обычно нет длинных удлинений или прочных межклеточных соединений. В заключение, эмбриональные ткани могут выживать при более низком содержании кислорода, чем зрелые клетки. Это делает их более устойчивыми к ишемическим условиям, имеющим место при трансплантации или в ситуациях in vitro. Исследования на эмбриональных клетках/тканях были вдохновляющими. Эмбриональные ткани могут быть использованы по различным показаниям, например, транслантанты эмбриональной печени быть использованы для борьбы с апластической анемией, кровь пуповины может служить альтернативой трасфузии цельной крови взрослых, эмбриональный трансплантант надпочечников был испытан для борьбы с хронической болью при артритах, эмбриональный трансплантант тимуса использовался для лечения различных иммунодефицитных состояний. Трансплантант из мозговой эмбриональной ткани был пересажен в гетеротопное положение, и наблюдалась пролиферация ткани. Нейротрансплантация эмбриональных тканей при паркинсонизме показала позитивные результаты в нескольких глобальных исследованиях. Существуют потенциальные возможности использования эмбриональных тканей в биоинженерии путем покрытия оболочкой/создания рассады из эмбриональных тканей на имплантатах, эндопротезах сосудов и других искусственных хирургических, спасающих жизнь приспособлениях, для улучшения их функционирования, и это также может увеличить срок службы этих дорогих приспособлений. Рациональное использование пре-HLA рассады из эмбриональных тканей в ортопедической, торакальной и нейрохирургии может привести к уменьшению длительного раздражения имлантата и интерфазы хозяина, и таким образом, к созданию лучших приспособлений, т.к. может быть создана более биодружелюбная интерфаза /5/.

Таким образом, эмбриональные стволовые клетки обладают большей способностью к пролиферации и большей пластичностью (способностью к более разнообразной дифференцировке), чем взрослые стволовые клетки, а так же низкой иммуногенностью.

# 2.2 Гемопоэтические стволовые клетки

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) определяются по их способности давать все гемопоэтические линии in vivo и поддерживать образование этих клеток в течение всей жизни человека. В отсутствие надежных прямых маркеров ГСК, их идентификация и подсчет зависят от функциональных и мультилинейных исследований репопуляции in vivo. Необыкновенно низкая встречаемость ГСК в любой ткани и отсутствие специфического ГСК фенотипа сделали их очистку и характеристику весьма трудной задачей. ГСК и примитивные гемопоэтические клетки могут быть отличимы от зрелых клеток крови по отсутствию у них линия - специфичных маркеров и присутствию некоторых других поверхностных антигенов, таких, как CD133 (для человеческих клеток) и c-kit и Sca-1 (у мышиных клеток). Функциональный анализ субпопуляций примитивных гемопоэтических клеток привел к созданию нескольких процедур для изоляции клеточных популяций, которые сильно обогащены клетками, проявляющими активность стволовых клеток in vivo. Упрощенные методы для получения этих клеток с высоким выходом были важны для практического использовании таких наработок /61/.

ГСК широко использовались для ауто и алло трансплантаций в течение десятилетий, хотя мало было известно об их миграции, выживании, самообновлении и дифференциации. Сортировка их по CD34 (+) маркеру, который они экспрессируют на клеточной поверхности, привела к открытию ГСК в CD34 (-) компартменте, что может предшествовать появлению CD34 (+) ГСК в процессе дифференцировки. До недавнего времени стволовые клетки в костном мозге считали специфичными для гемопоэза. Эксперименты, включающие клинические испытания, показали образование различных тканей, например, мускульных, нервных клеток и гепатоцитов, после трансплантации медуллярных клеток и опровергнули эту догму. Фактически, доказательства такой трасдифференцировки ГСК все еще отсутствуют, и данные могут быть получены при изучении дифференцировки других мультипотентных клеток, присутствующих в костном мозге, таких, как мезенхимальные стволовые клетки и более примитивные мультипотентные взрослые зародышевые клетки и клетки побочной популяции /10/.

В последние годы стало очевидным, что хемокин SDF-1 и его рецептор CXCR4 играют пилотную роль в нормальном гемопоэзе. Они являются важными для нормального онтогенеза гемопоэза в течение эмбриогенеза и продолжают играть ключевую роль в сохранении гемопоэтических прогениторных клеток в микроокружении костного мозга у взрослых. В сязи с этой роли прерывание взаимодействий SDF-1/CXCR4 приводит к мобилизации гемопоэтических прогениторных клеток, а стандартный протокол мобилизации препятствует им. Сходно, взаимодействия SDF-1/CXCR4 требуются для хоуминга и приживления трансплантанта во время трансплантации. SDF-1 регулирует локализацию лейкемических клеток, и, как их нормальные двойники, большинство лейкемических клеток отвечают на SDF-1 увеличенными адгезией, выживанием и пролиферацией. Однако в некоторых случаях ответы лейкемических клеток на SDF-1 могут быть разрегулированы, а влияние этого на прогрессирование болезни неизвестно /25/.

Было показано, что стволовые клетки из различных тканей способны дифференцироваться в клетки, характерные для отдельных тканей, по-видимому, в ответ на сигналы микроокружения. Это иерархическая пластичность. Показано, что как человеческие, так и мышиные клетки из нейросферы, имеющие потенциал дифференцироваться в нейроны, олигодендритные клетки и астроциты, продуцировали гемопоэтические стволовые клетки при пересадке в 3,5 дневные бластомеры овцы или мыши. Также продемонстрирована альтернативная форма пластичности стволовых клеток: функциональная пластичность на различных точках в клеточном цикле и на различных фазах циркадного ритма. Показано, что длительная пересадка обратимо варьирует по мере того, как примитивные мышиные стволовые клетки (линейные - негативные к родамину и Hoechst) переходят в клеточный цикл после стимуляции интерлейкином-3, ИЛ-6, ИЛ-11 и стальным фактором. Приживление трансплантанта дефектно в поздней S/ранней G2. Приживление транспланттанта заметно меняется вместе с циркадным ритмом. Предполагаемые механизмы для этих фенотипических сдвигов включают изменения в экспрессии белков адгезии с последующими изменениями в хоуминге в костный мозг. Показано, что дифференциация стволовых клеток заметно меняется в зависимости от фазы клеточного цикла. Имеются другие свойства гемопоэтической стволовой клетки, которые заставляют предположить, что это высокопластичная клетка обладает способностью быстро изменять свой мембранный фенотип и проявляет необычную направленную подвижность. Следовательно, пластичность, вызванная фазами клеточного цикла и циркадного ритма, должна быть рассматриваема, как важнейшая дополнительная черта фенотипа гемопоэтических стволовых клеток /46/.

Нормальный устойчивый гемопоэз происходит в микроокружении костного мозга. Растворимые факторы, также как контактные взаимодействия между гемопоэтическими клетками и микроокружением костного мозга, диктуют судьбу гемопоэтических клеток и прогениторных клеток. В последние десять лет стало ясно, что клетка-клетка и клетка - экстраклеточный матрикс взаимодействия через рецепторы адгезии играют главную роль в гемопоэтическом процессе. Они необходимы для резиденции стволовых клеток, так же, как и для хоуминга стволовых клеток и прогениторных клеток в костном мозге в месте поселения клеток трансплантанта стволовых клеток. Более того, рецепторы адгезии играют важную роль в регуляции поведения клеток, либо через прямую активацию сигнальных путей, важных для выживания клеток, клеточного роста и судьбы клеток или модулировании ответов на факторы роста. Понимание механизмов ненормальностей, видимых в этих взаимодействиях при болезнях гемопоэтической системы, поможет развить лучшие терапевтические стратегии, основанные на патогенезе этих болезней /45/.

ГСК являются привлекательной мишенью для генной терапии генетических болезней иммунной и гемопоэтической систем, и для лекарство - резистентных стратегий, в которых гены, ответственные за резистентность к различным хемотерапевтическим агентам, преобразовываются. Стволовые клетки относительно легко получить пункцией костного мозга или мобилизацией с помощью G-CSF в периферическую кровь, и обогатить с помощью анти - CD34 + моноклональных антител. Для обычной ретровирусной трансдукции нормальные покоящиеся ГСК должны быть активированы в клеточный цикл путем использования соответствующих цитокинов, и было критически важным найти комбинацию цитокинов, которые сохраняют способность к самообновлению на длительный период репопулирующих ГСК. Стало очевидным, что стратегии оптимизирующие ГСК цикл и провирусную интеграцию могут уменьшить способность трансдуцированных ГСК конкурировать in vivo против эндогенных ГСК или ГСК, которые не были активированы в клеточный цикл. Вирусные векторы могут интегрировать гены в неделящиеся клетки, но возрастает эффективность трансдукции, если ГСК активированы в G1-фазу клеточного цикла. Эта уменьшенная эффективность длительной трансплантации ГСК может быть связана с нарушенным самообновлением или уменьшенной эффективностью хоуминга в костный мозг. Последняя может быть связана с уменьшением модуляции хемокиновых рецепторов, необходимых для хемотактического хоуминга в костный мозг. В качестве альтернативы или дополнения, возможно, существуют уменьшение модуляции: (1) молекул адгезии ГСК, необходимых для адгезии к эндотелию и выхода из циркуляции; (2) металлопротеиназ, секретируемых ГСК, которые способствуют миграции через экстрацеллюлярный матрикс и обеспечивают критические растворимые факторы в микроокружении костного мозга. Более противоречивый взгляд заключается в том, что ведущие к смерти клеток пути, например, те, которые включают FasR (CD95), могут быть активированы находящимися в клеточном цикле ГСК, в результате чего наступает их селективная деструкция при трансплантации и локализации в сайтах, богатых Fas лигандами, таких, как печень /39/.

Ex vivo экспансия гемопоэтических предшественников, прогениторных клеток и стволовых клеток представляют современную эру клеточной терапии в 21 веке. В течение последних 10 лет развитие способов идентификации и очистки гемопоэтических стволовых клеток и цитокинов способствовали улучшению ex vivo технологий экспансии стволовых клеток. Однако технология пока не достигла такой стадии, когда размножившиеся ex vivo гемопоэтические прогеиторные и стволовые клетки могут рутинно использоваться для заместительной терапии. Уроки, полученные в последние 10 лет при исследованиях, сосредоточеных на развитии оптимальной ex vivo экспансии стволовых клеток, привели к гораздо лучшему пониманию биологии стволовых клеток. Это знание привело к новым попыткам ex vivo экспансии гемопоэтических предшественников, прогениторных клеток и стволовых клеток и должно привести к нового покаления клеточных терапий. Три области ex vivo экспансии стволовых клеток, которые определяют их клиническую осуществимость, включат в себя: (1) выбор оптимальной популяции стволовых клеток для экспансии; (2) определение желательных характеристик популяции стволовых клеток в состоянии экспансии, которые могут быть использованы при трансплантации; (3) развитие новых реагентов и процедур для экспансии и инфузии гемопоэтичесих прогениторных клеток и стволовых клеток /50/.

Поддержание зрелых клеток крови требует присутствия гемопоэтических стволовых клеток, характеристиками которых являются способность к самообновлению и образование дифференцированного потомства. Предлагается стохастическая модель для механизма самообновления и дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток с использованием in клональной культуральной техники in vitro. Недавний прогресс в молекулярной биологии способствовал изоляции и получению характеристик некоторых цитокинов (IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, G-CSF и фактор стволовых клеток factor (SCF)) /42/.

Таким образом, гемопоэтические стволовые клетки способны образовывать не только клетки крови, но и другие типы клеток. В настоящее время создаются способы увеличивающие выход ГСК из костного мозга. ГСК являются важнейшим источником получения собственных стволовых клеток.

# 2.3 Мезенхимальные стволовые клетки

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) были изолированы из костного мозга, надкостницы, трабекулярной кости, жировой ткани, синовиальной оболочки, скелетной мускулатуры и молочных зубов. Эти клетки обладают способностью дифференцироваться в клетки соединительной ткани, включая кость, жир, хрящ и мускулатуру. Много было выяснено в последние годы об изоляции и характеристиках МСК и о контроле над их дифференцировкой. Эти клетки вызвали большой интерес из-за перспектив их использования в регенеративной медицине и тканевой инженерии. Существуют драматические примеры, взятые из преклинического и клинического использования МСК, которые иллюстрируют их терапевтическую ценность. По мере того, как развивались новые методы, выявлено несколько аспектов взаимодействий имплантированных клеток с хозяином. Они должны быть рассмотрены перед тем, как понять лежащие в их основе механизмы. Взаимодействия м\имплантированных клеток с хозяином включают иммунный ответ хозяина на имплантированные клетки, механизмы хоуминга, которые направляют клетки к месту повреждения, и дифференциация in vivo имплантированных клеток под влиянием локальных сигналов /4/.

Популяции стволовых клеток найдены в большинстве взрослых тканей и в обшем их дифференцирочный потенциал может отражать локальные клеточные популяции. Были описаны гемопоэтические, эпидермальные, мезенхимальные, невральные и гепато - стволовые клетки были. Возможно, что во взрослом организме эти клетки являются резервуаром репаративных клеток, которые мобилизуются повреждением и мигрируют в рану, где в кооперации с локальными клетками участвуют в репаративном ответе. Мезенхимальные стволовые клетки, изолированные из костного мозга, имеют способность дифференцироваться в клетки соединительной ткани. Некоторые разительные примеры терапевтического использования МСК были недавно описаны для таких случакв, как коронарная болезнь артерий, повреждение спинного мозга, болезнь Паркинсона и регенерация печени. В ортопедической медицине МСК применялись для восстановления костей и хряща и при лечении остеоартрита. Вопрос о реакции хозяина на имплантированные МСК становится критическим по мере развития клинических приложений. Есть несколько аспектов взаимодействий имплантированных стволовых клеток с хозяином, которые нужно рассмотреть для понимания механизмов, лежащих в основе терапии стволовыми клетками. Это (1) иммунный ответ хозяина на имплантированные клетки, (2) механизмы хоуминга, которые направляют клетки к месту повреждения, (3) дифференциация имплантированных клеток под влиянием локальных сигналов /3/.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) являются предшественниками всех клеток соединительной ткани. МСК были изолированы из костного мозга и других тканей у взрослых множества видов позвоночных. Они размножались в культуре и диффренцировались в несколько ткань - образующих клеток, таких, как кость, хрящ, жир, мускулатура, сухожилие, печень, почки, сердце, даже клетки мозга. Последние достижения в практическом применении МСК при регенерации человеческого суставного мыщелока синовиального сустава являются примерами их функциональности и многосторонности /1/.

Таким образом, мезенхимальные клетки при дифференцировке образуют различные клетки соединительной ткани.

# 2.4 Стромальные стволовые клетки

Созданы линии человеческих мезенхимальных стволовых клеток, которые могут дифференцироваться в различные тканевые клетки, включая кость, нервные клетки, стромальные клетки костного мозга, поддерживать рост гемопоэтических стволовых клеток и так называемых “стромальных опухолевых клеток”, смешанных с опухолевыми клетками. Обладающие теломеразой человеческие стромальные клетки из костного мозга обладают повышенной продолжительностью жизни и поддерживают рост гемопоэтических клоногенных клеток. Перенос гена индийского ежа (дикобраза) существенно увеличил экспансию гемопоэтических стволовых клеток, поддерживаемую человеческими стромальными клетками костного мозга. Генномодифицированные мезенхимальные стволовые клетки полезны, как терапевтические инструменты для лечения повреждения мозговых тканей (например, в результате инфаркта мозга) и злокачественных мозговых неоплазм. Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток защищает мозг от острого ишемического повреждения при окклюзии среднемозговой артерии на животной модели. Полученный из мозга нейротропный фактор (BDNF) - генной трансдукции еще больше увеличил протективную эффективность против ишемического повреждения. Мезенхимальные стволовые клетки обладают отличной способностью к миграции и оказывают ингибиторный эффект на клетки глиомы. Генная модификация мезенхимальных стволовых клеток терапевтическими цитокинами увеличивает антиопухолевый эффект и пролонгирует выживание животных с опухолями. Генная терапия, использующая мезенхимальные стволовые клетки, как тканепротективный и направленный цитореагент является многообещающим подходом /21/.

Этот обзор посвящен стволовым клеткам костного мозга. Методы индентификации, культивирования, накопления клеточной массы и пересадки стволовых клеток описаны, включая выделение линий гемопоэтических и мезенхимальных линий стволовых клеток и детальный анализ, использующий многочисленные CD и другие маркеры для идентификации малых субпопуляций стволовых клеток. За секцией, посвященной стволовым клеткам крови пуповины, следует детальное обсуждение современной ситуации в клиническом использовании стволовых клеток, его последние неудачи, связанные с эпигенетическими факторами, различные подходы к открытию высокомультипотентных стволовых клеток костного мозга, и краткое описание эмбриологических подходов к идентификации базовых стволовых клеток костного мозга на самых ранних стадиях развития эмбрионов млекопитающих /16/.

Костный мозг взрослых млекопитающих содержит не одну, а две отдельные популяции взрослых стволовых клеток. Первой и наиболее хорошо охарктеризованной является популяция гемопоэтических стволовых клеток, ответственная за поддержание продукции в течение всей жизни клеток крови. Биологические характеристики и свойства второй резидентной популяции стволовых клеток костного мозга, называемых стромальными клетками костного мозга или мезенхимальными стволовыми клетками, значительно менее понятны. In vitro культуры, произошедшие из суспензии разделенного на отдельные клетки костного мозга различных видов млекопитающих, образуют колонии стромальных клеток костного мозга, каждая из которых происходит от одной клетки - предшественника, называемой колониеобразующий фибробласт. Были разработаны условия культивирования для выращивания стромальных клеток костного мозга in vitro, которые сохраняли способность дифференцироваться в кость, жир и хрящ. Значительная доля современных знаний об этой популяции клеток базируется на анализе свойств этих культур клеток, а не на свойствах первичных инициирующих рост колонии клеток. Современные данные заставляют предположить, что стромальные прогениторы в костном мозге in situ ассоциированы с внешней поверхностью сосудов и могут делить идентичность с сосудистыми перицитами /51/.

Таким образом, стромальные стволовые клетки костного мозга являются одним из видов мезенхимальных стволовых клеток.

# 2.5 Тканеспецифичные стволовые клетки

Полагают, что стволовые клетки важны для регенерации нескольких взрослых тканей. В последнее время были идентифицированы взрослые стволовые клетки с очень широким потенциалом дифференцировки, хотя не известно представляют ли они примитивные стволовые клетки или продукты исключительно редких событий дедифференцировки, включающие тканевоспецифичные стволовые клетки. Была также продемонстрирована трансдифференцировка тканевоспецифичных стволовых клеток за границы линии, но относительная неэффективность процесса in vivo, даже в присутствии тканевого повреждения, подвергает сомнению физиологическое значение такого механизма. Интересно, что среди взрослых стволовых клеток. которые культивируются ex vivo продолжительные периоды времени, способность изменять линию наибольшая. Если решения о судьбе нормальных разнообразных стволовых клеток могут быть изменены с высокой частотой in situ, могут быть представлены возможные регенеративные терапии для большого разнообрзия болезней. Интегральное понимание транкрипционной регуляторной сети, которая включает различные взрослые стволовые клетки, также, как и сигнальных путей, управляющих их дифференцировкой в терапевтически полезные клеточные типы, будет способствовать клиническому приложению этих волнующих открытий /8/.

Таким образом, тканевоспецифичные стволовые клетки способны дифференцироваться в другие типы клеток, но in vivo этот процесс малоэффективен. Тем не менее сейчас разрабатываются подходы, сделающие возможным использования этого источника стволовых клеток.

# 3. Ангиогенные стволовые клетки

Открывшаяся в настоящее время возможность изолировать стволовые клетки и изучать их специфичную способность самообновления с образованием различных клеточных типов открыла волнующую перспективу помочь восстановлению поврежденной ткани, и даже образования новых тканей. Процесс васкулогенеза (васкуляризация ишемических или инжиниринговых тканей) сходен с эмбриональным процессом в котором “гемангиобласты" дифференцируются в клетки крови, также как в примитивные сосуды. Хотя и обусловленный клетками происходящими из костного мозга, во взрослой жизни васкулогенный восстановительный механизм вносит лишь небольшой вклад в механизмы восстановления сосудов: а именно (i) ангиогенез (рост сосудов из существующих сосудов); и (ii) артериогенез (направляемое моноцитами увеличение калибра существующих артериолярных коллатералей). Большинство попыток увеличить восстановление сосудов с помощью стволовых клеток проходило с использованием факторов роста, которые мобилизовывали стволовые клетки из костного мозга в кровь, иногда комбинированное с изоляцией и реинфузией этих клеток после экспансии и дифференцировки ex vivo в эндотелиальные клетки - предшественницы. Четкое улучшение перфузии областей ишемии и васкуляризации наблюдалось in vivo в основном на животных моделях. Периферический хоуминг и его регуляция, а также (конечная) дифференцировка в местах восстановления сосудов менее изучены, но имеют первостепенное значение для эффективности и безопасности. Использование эмбриональных стволовых клеток встречает этические возражения. Более того, специальное внимание и меры требуются для того, чтобы преодолеть аллогенные барьеры, с которыми обычно сталкиваются эти клетки. В общем, длительное и сложное ex vivo культивирование, требующиеся для получения достаточного потомства от весьма небольшого числа стволовых клеток для использования в качестве стартового материала, дорого и обременительно. Как фундаментальные исследования концептуальных вопросов, так и работа по эффективному удешевлению продукта должны пройти долгий путь перед клиническим использованием в клинике/63/.

Таким образом, ангиогенные стволовые клетки происходят из костного мозга.

# 4. Рекрутирование (мобилизация) стволовых клеток

Высокомобильный групповой белок 1 (High mobility group box 1) (HMGB1) является негистоновым белком, требующемся для поддержания архитектуры хроматина. Последние исследования показали, что он может действовать, как цитокин, регулирующий различные биологические процессы, такие, как воспаление, миграция клеток и метастазирование. Ранее показано, что HMGB1 может пассивно освобождаться клетками, которые погибают в результате травмы или непрограммируемым путем, и может быть сигналом повреждения тканей. HMGB1 может рекрутировать стволовые клетки: HMGB1 индуцирует стволовые клетки к трансмиграции через эндотелиальный барьер, более того, когда шарики, содержащие HMGB1 имплантировали в здоровый мускул, они рекрутировали стволовые клетки, введенные в общую циркуляцию. Роли HMGB1 в воспалении и в регенерации тканей могут быть строго взаимосвязаны /43/.

Мобилизация гемопоэтических стволовых клеток и клеток - прогениторов из костного мозга в циркуляцию повторяющимися ежедневными стимуляциями только G-CSF или в комбинации с циклофосфамидом все шире используется в клинике; однако механизм этого все еще не до конца понят. Более того, вслед за мобилизацией стволовые клетки возвращаются назад в костный мозг, что заставляет предположить, что освобождение/мобилизация и хоуминг представляют собой последовательные события со своими физиологическими ролями. Ранее была определена роль для мобилизации стволовых клеток цитокинов, таких, как G-CSF SCF, и молекул адгезии, таких, как VLA-4 и P/E селектины. Результаты последних исследований с использованием моделей на экспериментальных животных и клинические протоколы мобилизации продемонстрировали важное участие хемокинов, таких, как происходящий из стромы фактор 1 (stromal derived factor-1 (SDF-1)) и интерлейкин-8, также, как эластаза и катепсин G в процессе мобилизации /29/.

CD34 (+) гематопоэтические стволовые клетки из периферической крови обычно используются для аутологичной или аллогенной трансплантации, следующей за терапией высокими дозами при злокачественных заболеваниях. Применение таких гемопоэтических факторов, как G-CSF, сильно увеличивает мобилизацию CD34 (+) клеток. Механизм мобилизации стволовых клеток все еще не ясен. Похоже, что это многоступенчатый процесс с участием цитокинов и молекул адгезии. Важную роль в мобилизации и хоуминге CD34 (+) клеток играют гемопоэтические факторы роста, хемокины и молекулы адгезии CD34 (+) клеток. Лекарства, такие, как моноклональные антитела, специфические пептиды или олигонуклеотиды, имеют целью молекулы адгезии /28/.

Мобилизация гемопоэтических прогениторных клеток, как оказалось, является мультифакторным процессом, который, по крайней мере частично, регулируется на уровне микроваскулярного эндотелия костного мозга (МВЭКМ). С целью изучения регуляции миграции прогениторных клеток эндотелием in vitro были развиты методы изоляции МВЭКМ из аспиратов костного мозга. Обретшие бессмертие МВЭКМ клеточные линии были сгенерированы. При использовании модели миграции через эндотелий костного мозга in vitro показано, что только небольшое число более зрелых, дифференцированных прогениторных клеток мигрируют спонтанно. В этой модели участвуют молекулы адгезии семейства бета2-интегрина и соответствующие им эндотелиальные лиганды. Низкая спонтанная миграционная способность предполагает, что дополнительно к молекулам адгезии, которые опосредуют прямые клеточные контакты, паракринные цитокины и хемокины могут играть роль в миграции прогениторных клеток через эндотелий. Стимулированные фактором роста гемопоэтические клетки могут продуцировать цитокины, которые действуют на эндотелиальные клетки (сосудистый эндотелиальный фактор роста - VEGF), модифицируя их подвижность, рост, проницаемость и распределение. Поэтому VEGF может участвовать в мобилизации и хоуминге гемопоэтических стволовых клеток. Более того, трансэндотелиальная миграция прогениторных клеток in vitro существенно увеличивается хемокином из стромы stromal-cell-derived factor-1 (SDF-1), который продуцируется стромальными клетками костного мозга. Более примитивные прогенаторы, которые не мигрируют спонтанно, также реагируют на хемокин. Сделан вывод, что трасэндотелиальная миграция прогениторных клеток регулируется молекулами адгезии, паракринными цитокинами и хемокинами. Stromal-cell-derived factor-1 (SDF-1), мобилизующие гемопоэтические факторы роста стимулируют пролиферацию гемопоэтических клеток, которая может о приводить к изменениям в локальной “атмосфере” цитокинов и хемокинов непрямым образом и в конце концов приводить к мобилизации гемопоэтических прогениторных клеток /37/.

Гемопоэтические прогениторные клетки, мобилизуемые в переферическую кровь, теперь широко используются в трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток для лечения ряда злокачественных и некоторых незлокачественных болезней. Хотя изначально использовалась только химеотерапия, все современные протоколы лечения в настоящее время включают использование цитокинов, с или без химеотерапии. Развитие получила предварительная терапия рака с целью получения урожая прогениторных клеток, расширились знания о кинетике мобилизации и совершенствовались необходимые навыки в собирании и криоконсервации прогениторных клеток. Для предсказуемого исхода Более аккуратные измерения числа гемопоэтических прогениторных клеток и определение необходимого их количества для оптимального выздоровления после терапии высокими дозами химиопрепаратов были разработаны. Хотя использование G-CSF обычно оказывается успешным, у некоторых пациентов не удается добиться достаточной мобилизации или требуется дополнительное число отборов клеток. Клинические исследования цитокинов раннего действия, фактора стволовых клеток в комбинации с G-CSF продемонстроровали увеличенный выход прогениторных клеток у ряда пациентов, что может дать клинические преимущества в избранных ситуациях. На животных моделях, и в меньшей степени у людей, другие цитокины, такие, как тромбопоэтин и Flt-3 лиганд или некоторые малые молекулы с единичной или множественной активностью агонистов для цитокиновых рецепторов (IL-3, Flt-3L, TPO, G-CSF) также оказались многообещающими мобилизационными агентами. Дальнейшие исследования относительной важности клеточной пролиферации, клеточной адгезии и роли вспомогательных клеток и других сигнальных событий ведут к улучшению понимания механизмов, лежащих в основе мобилизации гематопоэтических прогениторных клеток. Введение надлежащей химиотерапии высокими дозами вслед за реинфузией гематопоэтичесих прогениторных клеток, способных к длительной существованию, уже давно применяется в лечении ряда злокачественных (преимущественно гематологических) и незлокачественных болезней. В течение многих лет прогениторные клетки получали прямой аспирацией костного мозга при анестезии, отсюда термин трансплантация костного мозга. Однако было достигнуто понимание, что гемопоэтические стволовые клетки можно получать из периферической крови, хотя и в небольших количествах, а также из пуповинной крови. Дальнейшее эмпирическое изучение показало, что число гемопоэтических прогениторных клеток, циркулирующих в крови, может быть временно увеличено после химеотерапии и/или введения одного или нескольких цитокинов. Улучшения клинической практики мобилизации прогениторных клеток, сбора и размножения клеток оказались столь успешными, что во многих случаях стволовые клетки крови заместили костный мозг, как предпочтительный источник /19/.

Таким образом, в процессе мобилизации стволовых клеток принимают участие некоторые белки хроматина, цитокины, хемокины и молекулы адгезии.

# 5. Пролиферация стволовых клеток

Вклад стволовых клеток в ранние фазы гемопоэтической трансплантации противоречив, также как и вопрос о числе стволовых клеток, необходимых для успешной длительной трансплантации у человека. Существует большое количество данных для мышей, но степень обоснованности их переноса на человека дискуссионна. Другие варьирующие показатели, касающиеся стволовых клеток, включают их эффективность в хоуминге в костный мозг, их предыдущая пролиферативная история, влияющая на длину теломеров и их способность усиливать активность теломеразы. Степень увеличения числа стволовых клеток in vivo после трансплантации или ex vivo после стимуляции цитокинами обсуждается и поднят вопрос о нестохастических внешних влияниях для изменения вероятности самообновления стволовых клеток /38/.

Гематопоэтические стволовые клетки (ГСК) образуют все клетки крови и иммунные клетки и используются в клинических протоколах по трансплантации для лечения разнообразных заболеваний. Способность увеличивать число ГСК vivo или in vitro обеспечит новые возможности для лечения, но амплификации ГСК было трудно достигнуть. Понимание механизмов самообновления ГСК сделало амплификацию ГСК важной клинической целью /53/.

Микроокружение костного мозга представляет собой сложную трехмерную структуру, где гемопоэтические клетки пролиферируют, приобретают зрелость, мигрируют в синусоидальное пространство и выходят в циркуляцию регулируемым образом. Стромальные клетки в микроокружении костного мозга обеспечивают подходящее окружение для самообновления, пролиферации и дифференцировки гемопоэтических клеток. Внутри гемопоэтического микроокружения существует эмбриональный желточный мешок, зародышевая печень или взрослый костный мозг. Микроваскулярный эндотелий не только действует, как сторож ворот, контролирующий траффик и хоуминг гемопоэтических прогенаторов, но также обеспечивает клеточный контакт и секретирует цитокины, которые разрешают сохранение устойчивого состояния гемопоэза. В последнее время гомогенные слои эндотелиальных клеток костного мозга были изолированы и культивировались в условиях клеточной культуры. Длительные культуральные исследования показали, что монослои эндотелиальных клеток костного мозга являются уникальным типом эндотелия и могут поддерживать длительную пролиферацию гемопоэтических прогенаторных клеток, в особенности мегакариоцитов и миелоидных прогенаторных клеток путем выработки линия - специфичных цитокинов, таких, как G-CSF, GM-CSF, M-CSF, Kit-лиганд, IL6, FLK-2 лиганд и ингибиторный фактор лейкемии. Прямые клеточные контакты между гемопотическими прогенаторными клетками и эндотелиальными клетками костного мозга через специфические молекулы адгезии, включающие бета1, бета2 интегрины и селектины играют критическую роль в траффике и возможно пролиферации гемопоэтических стволовых клеток. Дисфункции микрососудистых эндотелиальных клеток в гемопоэтическом микроокружении могут приводить к расстройствам функции стволовых клеток и прогрессировании пластических анемий, а также вносят вклад в нарушения приживления трансплантанта при трансплантации костного мозга. Дальнейшее изучение роли микроваскулярного эндотелия в регуляции хоуминга гематопоэтических клеток может увеличить наше знание о патофизиологии стволовых клеток и лейкемии /47/.

Интерлейкин - 3 является мультипотентным фактором роста, продуцируемым активированными Т клетками, моноцитами/макрофагами и стромальными клетками. Человеческий ген IL-3 локализуется на хромосоме 5 около сегмента 5q31. Рецептор высокой аффинности для человеческого IL-3 состоит из альфа и бета субъединиц. IL-3 делит общую бета субъединицу с гранулоцит - макрофаг колние-стимулирующим фактором (GM-CSF) и IL-5; эта субъединица картируется на хромосоме 22q13.1 Биологические эффекты IL-3 изучались на человеческих и мышиных линиях гематопоэтических клеток и нормальных клетках человеческого костного мозга. Добавление IL-3 к культуральной среде индуцирует пролиферацию, созревание и возможно самообновление плюрипотентных гемопоэтических стволовых клеток и клеток миелоидной, эритроидной и мегакариотической линий. Человеческий IL-3 был клонирован в 1986 году, и с этого времени различные клинические исследования подтвердили in vivo потенциал рекомбинантного человеческого (rhIL-3). Первоначальные результаты исследования фазы I/II IL-3 в дозе 5-10 микрограм/кг подкожно ежедневно в течение 5-10 дней у пациентов с рецидивом лимфом, малоклеточным раком легкого, раком груди и раком яичников показали, что постхимеотерапевтическое применение IL-3 индуцируют более быструю регенерацию гранулоцитов и тромбоцитов. Однако эти результаты не были подтверждены для 111 стадии. Роль применения только IL-3 в лечении миелопластического синдрома, апластической анемии и других болезней костного мозга была также разочаровывающей. Однако предварительное изучение IL-3 в комбинации с химеотерапевтическими агентами и иммуносупрессивной терапией продемонстрировали обнадеживающие результаты у пациентов с миелопластическим синдромом и апластической анемией. Терапевтический потенциал IL-3 определяется увеличением выхода стволовых клеток из периферической крови. Первые результаты по комбинирорванию IL-3 с GM-CSF или позднее - действующими факторами роста, такими, как гранулоцит - колониестимулирующий фактор показали увеличение выхода стволовых клеток периферической крови. В последние годы доступность агонистов синтетического рецептора IL-3 (IL-3R) и сходных химерических молекул с большей активностью in vitro и меньшими воспалительными побочными эффектами увеличило возможности использовать и сравнивать эти молекулы и rhIL-3 для предотвращения индуцированной химеотерапией миелосупрессии. Роль IL-3 и IL-3R агонистов в ex vivo экспансии стволовых клеток требует дальнейшего изучения. Представляется, что будущее применение IL-3 в комбинации с другими цитокинами является привлекательным путем для предотвращения связанной с лечением смертности и заболеваемости у онкологических пациентов /34/.

Таким образом, пролиферация стволовых клеток является сложнорегулируемым процессом, в котором играют роль, как межклеточные взаимодействия, так и растворимые факторы (цитокины и др.).

# 6. Хоуминг стволовых клеток

В биологии стволовых клеток хоумингом называется поселение ствловых клеток в месте повреждения (в широком смысле слова) и поселение трансплантата гемопоэтических клеток в костный мозг (в узком смысле слова).

Рост и дифференцировка гемопоэтических стволовых клеток являются высоко зависимыми от регуляторных молекул, продуцируемых стромальными клетками костного мозга. Данные, накопленные в последние годы, показали, что рецепторы адгезии на гемопоэтических клетках и их лиганды на стромальных клетках и экстрацеллюлярном матриксе играют критическую роль в этих взаимодействиях. Интегрины семейтсва бета 1, в основном VLA-4 и VLA-5, наиболее хорошо охарактеризованы и были идентифицирорваны, как определяющие место прогениторных клеток в гемопоэтической иерархии, определяемой их долговременной способностью к репопуляции in vitro и in vivo. Функциональные исследования показали, что большинство прогениторных клеток эффективно связывются с эндотелиальными клетками костного мозга через бета 1 интегрин, и были описаны линия - и стадия созревания - специфичными различия. Существуют данные о прямом контроле поздней эритроидной дифференцировки VLA-4, но не ясно является ли критически важным участие бета 1 интегринов в функционировании гемопоэтических стволовых клеток в более незрелых стадиях. Многие другие интегриновые и неинтегриновые рецепторы участвуют в адгезивных взаимодействиях и экспрессируются на гемопоэтических прогениторных клетках и жестко регулируются в течение дифференцировки, но их функция остается противоречивой /12/.

У здоровых взрослых гемопоэз происходит в костном мозге, где находится большинство гемопоэтических клеток - прогениторов (ГКП). У пациентов, проходящих курс хемо и/радиотерапии, гемопоэз серьезно нарушен. Восстановление функции костного мозга может быть достигнуто трансплантацией костного мозга или трасплантацией стволовых клеток из периферической крови. Успех трансплантации стволовых клеток зависит от способности внутривенно введенных стволовых клеток размещаться в костном мозге. Этот процесс называется хоумингом. Однако, молекулярный механизм, управляющий этим процессом еще плохо понят. Выдвинута гипотеза, что хоуминг является многоступенчатым процессом, состоящий из адгезии ГКП к эндотелиальным клеткам синусоид костного мозга, за которым следует трансэндотелиальная миграция, направляемая хемоатрактантами, и закрепление во внесосудистых пространствах костного мозга, где уже происходят пролиферация и дифференцировка. В этом связи важны роли хемокина происходящего из стромы фактора 1 (SDF-1) и его рецептора CXCR-4, участие молекул адгезии в индукции полимеризации актина в ГКП. Определение роли хемокинов и молекул адгезии в миграции и приживлении трансплантанта стволовых клеток человека поможет раскрыть внутренние механизмы, которые регулируют хоуминг стволовых клеток, и, в конечном счете, приведет к прогрессу в трансплантации стволовых клеток /59/.

Все зрелые клетки крови могут быть получены из ГСК. Как и все другие гемопоэтические клетки, стволовые клетки мобильны, и эта способность к мобильности позволила трансплантации костного мозга стать рутинной клинической процедурой. Успешная трансплантация требует, чтобы гемопоэтические стволовые клетки поселились в костном мозге, вышли из периферического кровообращения и были стабилизированы в регуляторных нишах во вне сосудистом пространстве костного мозга. Этот процесс хоуминга обратим - гемопоэтические стволовые клетки могут быть освобождены из костного мозга за счет молекулярных взаимодействий, что также важно в хоуминге после за трансплантации. Молекулярные события, регулирующие этот двунаправленный процесс, начинают устанавливаться, и появилось много новых данных, которые проливают свет на процессы в этих сложных физиологических событиях /60/.

Хоуминг транспалантированных стволовых клеток в костный мозг реципиента является критическим шагом в приживлении трасплантанта и инициировании реконструкции костного мозга. В настоящее время достигнуто только частичное понимание клеточных и молекулярных механизмов, управляющих хоумингом. Существует только неполный список молекул адгезии, участвующих в направлении траффика стволовых клеток в микроокружение костного мозга. Альтернативная гипотеза, которая связывает хоуминг с организованным и оркестрованным каскадом событий или со случайной миграцией цирулирующих клеток, находит достаточное экспериментальное подтверждение. Также неопределенна судьба осевших в костном мозге клеток вскоре после трансплантации и скорость, с которой они начинают пролиферировать в своем новом микроокружении. Ограниченное число исследований в этом направлении и несоразмерность в их экспериментальном дизайне увеличивает неразбериху, окружающую эти критические аспекты биологии стволовых клеток. Однако эта область исследований быстро развивается и приближается получение результатов, проясняющих многие из этих вопросов /54/.

Селектины - это лектины клеточной поверхности, участвующие в опосредовании адгезии белых клеток крови к эндотелиальным клеткам и тромбоцитам. Они распознают фукозилированные, сиализированные и в некоторых случаях сульфатированные лиганды, экспрессируемые на гликопротеинах, служащих как функциональные контр - рецепторы. Селектины регулируются на уровне траскрипции, через протеолитический процессинг, через клеточную сортировку и через регулируемую экспрессию гликозил - трансферераз, ответственных за образование функциональных лигандов. Селектины физиологически важны при воспалении, хоуминге лимфоцитов, иммунологических ответах и хоуминге стволовых клеток костного мозга. Они играют роль при атеросклерозе, повреждении ишемии - реперфузии, воспалительной болезни и метастатическом распространении некоторых опухолей /32/.

Недавнее открытие того, что взрослые стволовые клетки способны образовывать новые кровеносные сосуды и клетки паренхимы в тканях, которые они колонизируют, вызвали огромный оптимизм и надежду на то, что эти клетки обеспечат функциональное восстановление поврежденного органа. Использование взрослых стволовых клетк ля регенеративной медицины ставит задачу получения эти клеток в нужном месте с минимальной смертностью и максимальной эффективностью. В идеале тканевоспецифичная колонизация должна быть достигнута путем внутрисосудистого введения стволовых клеток и использования нормальных физиологических процессов, управляющих клеточным траффиком. Критическим для успеха этого направления является использование стволовых клеток, несущих соответствующие мембранные молекулы, которые опосредуют хоуминг из сосудов в тканевой компартмент. Гемопоэтические клетки экспрессируют новую гликоформу CD44, известную, как E-/L-selectin лиганд гемопоэтических клеток (HCELL). Эта молекула является наиболее сильным Е-селектин лигандом, экспрессируемом в любой человеческой клетке /48/.

Таким образом, хоуминг стволовых клеток регулируется межклеточными взаимодействиями и растворимыми факторами. Особую роль в хоуминге принадлежит селектинам.

# 7. Маркеры стволовых клеток

Стволовые клетки были идентифицированы и охарактеризованы в различных тканях. Обсуждаются возможные общие свойства стволовых клеток. Высказано предположение, что независимо от их линейного происхождения, стволовые клетки отвечают сходным образом на регуляторные сигналы самообновления и дифференцировки, и похоже на то, что контроль клеточного цикла, контроль ассиметрии/дифференцировки, механизмы клеточной защиты и репарации ДНК и связанные апоптоз/старение сигнальные пути имеют более высокий уровень регуляции в стволовых клетках, возможно, за счет сходных механизмов. Предложен набор генов кандидатов, специфичных для стволовых клеток /9/.

Таким образом, предложен набор генов, характерных для всех стволовых клеток (генные маркеры стволовых клеток).

# 8. Болезни стволовых клеток

Предложена новая концепция классификации болезней стволовых клеток: (1) аплазия стволовых клеток (апластическая анемия); (2) пролиферативный синдром гемопоэтических стволовых клеток (лейкемия и миелодиспластический синдром); (3) пролиферативный синдром поликлональных гематопоэтических клеток (системные и органоспецифичные аутоиммунные заболевания). Рассатриваются следующие две группы болезней стволовых клеток: болезни мезенхимальных клеток и органоспецифичные болезни стволовых клеток. Связанные с возрастом болезни, такие, как болезнь Альцгеймера, остеопороз и фиброз легких принадлежат к первой, в то время, как карциносаркома в легких и аденокарцинорма эндокринных клеток в животе принадлежит ко второй. Предложен новый метод трансплантации аллогенного костного мозга с использованием резистентных к химеризму, подверженных аутоиммунным заболеваниям MRL/lpr мышей. В этом методе клетки костного мозга, содержащие небольшое количество Т клеток и мзенхимальных стволовых клеток инъецировались непосредственно в полость костного мозга. MRL/lpr мыши, леченные инъециями стволовых клеток, жили более 2 лет без симптомов аутоиммунного заболевания. Для приложимости этого метода к людям разработана его модификация для стволовых клеток костного мозга, полученных от обезьян. В этом методе клетки получали из длинных костей с использованием перфузионного метода, и инъецировали их прямо в полость костного мозга реципиентов. Этот новый метод может стать мощной стратегией лечения различных трудноизлечимых заболеваний /24/.

Таким образом, в настоящее время определены болезни, которые являются болезнями стволовых клеток.

# 9. Модели для изучения человеческих стволовых клеток

Область изучения мышиных моделей ксенотрансплантации очень выросло в последние две декады. Многие важные аспекты биологии человеческих стволовых клеток могут быть исследованы in vivo с использованием иммунодефицитных мышей, поэтому число различных линий и моделей постоянно увеличивается /35/.

Таким образом, многие вопросы биологии стволовых клеток человека могут быть исследованы на моделях на животных.

# 10. Иммунология стволовых клеток

Несколько исследований показали, что терапия клеточной трансплатацией, проводившаяся вслед за инфарктом миокарда обладает определенной эффективностью в способствовании заживлению миокарда и последующим восстановлением его функции Крупномасштабная продукция человеческих эмбриональных стволовых клеток, дающих при дифференцировке кардиомиоциты может потенциально обеспечить обильный запас донорских клеток для миокардиальной трансплантации. Существуют, однако, иммунологические барьеры для их использования в клинической терапии у человека. Новый подход состоит в использовании полученных из человеческих эмбриональных клеток кардиомиоцитов для репрограммирования аутологичных взрослых стволовых клеток для экспрессирования кардиомиогенной функции вместо того, чтобы прямо использовать их для трансплантации. Это может быть достигнуто с помощью нескольких новых технологий. Цитопласты с удаленным ядром, полученные из кардиомиоцитов, в свою очередь полученные из эмбриональных стволовых клеток, могут быть внесены в аутологичные взрослые стволовые клетки для получения цитоплазматических гибридов. Взрослые стволовые клетки могут также быть временно пермеализированы и подвергнуты действию цитоплазматичесих экстрактов, полученных из этих кардиомиоцитов. Или альтернативно, интактные или энуклеированные цитопласты из кардиомиоитов, полученных из человеческих эмбриональных стволовыф клеток могут быть культивируемы совместно со взрослыми стволовыми клетками in vitro для обеспечения клеточных контактов и электрических соединений, которые могут способствовать некоторой трансдифференцировке /23/.

Изолированные из ранней бластоцисты эмбриональные стволовые клетки захватывают короткий момент плюрипотентности в развивающемся эмбрионе, о чем свидетельствует их дифференцировка во многие типы соматических клеток in vitro. Хотя эти свойства помогают удовлетворить спрос на “запасные части" для замещения больных или изношенных тканей, их использование в так называемой терапии клеточной замены ставит несколько проблем, не последней из которых является их последующее отторжение. Эмбриональные стволовые клетки могут порождать клеточные типы, необходимые для лечения болезни, в то же время они являются источником гемопоэтических стволовых клеток или терминально дифференцированных дендритных клеток, которые могут содействовать индукции трансплантационной толерантности к замещающим тканям /17/.

Трансплантация стволовых клеток при аутоиммунной болезни отягощена отсутствием определенных клинических данных, способных подтвердить ее пользу. Этот недостаток усугубляется по мере того, как растет стимул ввести и оценить ценность дополнительных технологий, направленных на увеличение безопасности и эффективности процедуры. Развитие эффективного суррогатного анализа для предсказания исхода путем измерения возродившихся аутоиммунных клонов или путем применения основанных на геномике или протеомике технологий для определения ранних рецидивов болезни может иметь ценность для определения преимуществ этих модификаций без необходимости проводить полномасштабные, длительные, рандомизированные исследования. Введение более безопасных аллогенных трансплантационных технологий может увеличить эффективность процедуры, в то время, как работа над пластичностью стволовых клеток костного мозга и/ или интеграции предполагает, что трансплантация стволовых клеток может служить не только для остановки аутоиммунного процесса, но также поставлять клетки, способные заживлять или регенерировать больные органы. Введение терапевтических трансгенов в трансплантируемые клетки может увеличить эффективность трансплантации стволовых клеток, хотя регуляторные сложности испытаний генной терапии, возможно, затормозят этот процесс. Все эти инновации обеспечат большие изменения в практике и целях трансплантации стволовых клеток для лечения аутоиммунных заболеваний в следующем десятилетии /7/.

Lewis X антиген (Le (X)) является маркером стволовых эмбриональных клеток, эмбриональных клеток карциномы, мультипотентных клеток раннего эмбриона у мышей. Le (X) расположен на разветвленных, высокого молекулярного веса поли-N-ацетиллактозаминах (эмбриогликанах). В то время, как эмбриогликан присутствует в человеческих эмбриональных клетках карциномы, он не экспрессируется в человеческих эмбриональных стволовых клетках или клетках внутренней массы. Вместо этого эти клетки экспрессируют SSEA-3 и SSEA-4, оба из которых находятся на гликолипидах. Le (X) является маркером изначальных зародышевых клеток или мультипотентных стволовых клеток, полученных из изначальных зародышевых клеток у мыши и человека. У других видов позвоночных Le (X) широко экспрессируется в ранних эмбриональных клетках и изначальных зародышевых клетках, но способ экспрессии не является полностью одинаковым среди различных видов. Le (X) экспрессируется в невральных стволовых клетках у человека и мышей. Гемопоэтические стволовые клетки не экспрессируют эти углеводные маркеры. Маркером этих клеток является CD34, связанный с мембраной сиаломуцин. Другой сиаломуцин, CD164 (MGC-24v), экспрессируется гемопоэтическими прогениторными клетками. В качестве функции для Le (X) в стволовых клетках предложено способствование действию интегрина, что основано на анализе гликопротеинов маркера, экспериментов по трансфекции сДНК и ингибиторных эффектах анти - Le (X) антител. Наиболее вероятно, что Le (X) антиген, также как поли-N-ацетиллактозамины участвует во взаимодействиях на той же самой мембране. С другой стороны О-связанные олигосахариды CD34 и CD164, вероятно, участвуют в регуляции клеточной адгезии и пролиферации через межклеточное узнавание /40/.

Таким образом, иммунология стволовых клеток является важным разделом биологии стволовых клеток. Особый интерес здесь вызывают иммунологические реакции, вызываемые введением аллогенного трансплантанта стволовых клеток, и определение антигенных маркеров различных типов стволовых клеток.

# 11. Генетика стволовых клеток

# 11.1.Ремоделирование хроматина

Биология стволовых клеток было в последнее время качественно изменилась. Дифференциация стволовых клеток (гемопоэтических и негемопоэтических) рассматривалась иерархичной по природе, но последние данные заставляют предположить, что не существует иерархии клетка-прогенитор/стволовая клетка, но скорее обратимый континуум. Фенотип стволовых клеток (гемопоэтический и негемопоэтический), общая способность к дифференцировке (гемопоэтической и негемопоэтической), экспрессия генов, так же, как другие функциональные характеристики (хоуминг, экспрессия рецепторов и молекул адгезии) варьируют в течение клеточного цикла весьма широко. Это представляется зависимым от изменений в хроматине и экспресии генов по мере прохождения клеточного цикла. Опубликованные данные по ДНК метилированию, ацетилированию гистонов и также и РНК, главных регуляторов активности генов, сочетаются очень хорошо и дают объяснение этих главных событий биологии стволовых клеток. Эти черты стволовых клеток, упомянутые выше, довольно трудно понять с точки зрения классической иерархической биологии, но они становятся понятными, когда проводится корреляция с лежащими в их основе эпигенетическими изменениями. Происходит вступление в новую эру биологии стволовых клеток - эру “хроматиномики” /11/.

Таким образом, основные события в биологии стволовых клеток связаны с изменениями в хроматине. Возникла новая наука - хроматиномика.

# 11.2 Самообновление стволовых клеток

Гематопоэтичесие стволовые клети самообновляются в течение всей жизни, но нет точного понимания молекулярных механизмов этого процесса и его регуляции. На основании исследований об оверэкспрессии и нокаута, были описаны гены, влияющие на самообновление стволовых клеток, включая транскрипционные факторы, регуляторы клеточного цикла и гены, влияющие на структуру хромосом. Представлена модель, в которой эти отдельные классы молекулярных регуляторов интегрированы. Она сфокусирована на роли G1/S последовательности в развитии переключений по направлению самовозобновления стволовых клеток против дифференцировки. Экспериментальное изучение этой модели и других родственных гипотез может повести к более полному описанию самовозобновления гемопоэтических клеток и его регуляции, как в нормальных физиологических процессах, так и при прикладных терапиях /56/.

Способность к поддержанию и самовосстановлению - генерации дочерних клеток, имеющих такие же регенеративные свойства, как и родительские клетки - является определяющей чертой гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Существует убедительные доказательства того, что самообновление находится под внешним биологическим контролем in vivo. Разнообразные цитокины, морфогенетические лиганды и ассоциированные сигнальные компоненты влияют на самообновление в культуре и in vivo. Специфические транскрипционные факторы действуют, как сильные внешние агонисты самообновления ГСК in vitro и in vivo, когда на них действуют либо трансдуцированные ДНК, либо введенные извне белки. Эти открытия углубляют знание механизмов и пригодны для расширения достижений клинически полезных уровней ГСК /49/.

Все зрелые клетки крови происходят из небольшой популяции самообновлящихся плюрипотентных гемопоэтических стволовых клеток. Способность к самообновлению характеризует все стволовые клетки, как нормальные, так и неопластические. Интересно, что согласно новейшим исследованиям самообновления важно для поддержания существования опухолевых клеток, что предполагает значение этого процесса для терапии. К сожалению, молекулярные основы самообновления у клеток позвоночных пока еще слабо определены /31/.

Таким образом, существуют гены, влияющие на самообновление стволовых клеток, включая транскрипционные факторы, регуляторы клеточного цикла и гены, влияющие на структуру хромосом. Разнообразные цитокины, морфогенетические лиганды и ассоциированные сигнальные компоненты влияют на самообновление в культуре и in vivo

# 11.3 Дифференцировка стволовых клеток

Относительный состав оснований ДНК регуляторных последовательностей недетерминированных полипотентных родоначальных клеток может иметь значение для частоты транскрипции этих генов при клеточной дифференцировке. Последовательности этих регуляторных областей генов клеточной детерминации, которые обогащены А-Т, создают потенциал для транскрипции из-за их более низко температуры плавления и склонности к связыванию. Одна или несколько групп высокой мобильности хроматиновых белков преимущественно связываются с богатыми АТ регуляторными последовательностями, что приводит к увеличению уровня транскрипции. Нефосфорилированные гистоны, реагирующие с теми же регуляторными сайтами, могут увеличивать частоту транскрипции. Уровень клеточного роста, т.е. суммарный белковый синтез клетки позитивно коррелирует с синтезом белков хроматина высокой мобильности. Синтез гистонов H1 связан с репликацией ДНК. Несбалнсированный рост изменяет количество белков высокой мобильности и H1 гистонов, таким образом, изменяя уровень транскрипции. Чем больше обогащение АТ последовательностями регуляторных областей генов клеточной детерминации, тем в большей степени АТ - обогащенные регуляторные последовательности ответственны за раннюю экспрессию генов клеточной детерминации в течение эмбрионального развития. Преимущественное связывание H1 гистонов с более АТ - обогащенными регуляторными последовательностями ограничивает их транскрипцию по сравнению с генами клеточной детерминации /20/.

Представлена контролируемая компьютером цейтраферная система для изображения культивируемых гемопоэтических клеток, меченных для экспрессии различных флуоресцирующих белков. Во-первых, описаны эксперименты по оптимизации визуализации трех вариантов зеленых флуоресцирующих белков (циан-, зеленый и желтый усовершенствованный флуоресцентный белок) и красный флуоресцентный белок (DsRed) с помощью стандартной с широкой областью регистрации флуоресцентной микроскопии. Во-вторых, описаны процедуры для лучшего распознавания комбинаций клеток, экспрессирующих эти белки, с использованием семи коммерчески доступных комплектов фильтров, основанные на относительных интенсивностях флуоресценции индивидуальных флуоресцентных белков. Даны рекомендации о том, какие из этих фильтров выбирать при работе со специфическими флуоресцентными белками /55/.

Существуют большие генетически детерминированные количественные вариации в числе и функции гемопоэтических стволовых клеток в инбредных линиях мышей. Более того, старение гемопоэтических клеток генетически детерминировано. Генная идентификация в характерных локусах (местоположениях), участвующих в регуляции и старении гематопоэтических стволовых клеток обеспечит новые инсайты в регуляторные механизмы, которые имеют значение in vivo и могут быть клинически важны. Описаны стратегии для картирования и идентификации генов характерных локусов, которые участвуют в регуляцию гематопоэтических стволовых клеток /52/.

Восстановление тканей - это процесс, когда множество поврежденных типов клеток замещается для восстановления гистоархетоктоники и функции ткани. Несколько теорий было предложено для объяснения феномена тканевого восстановления у амфибий и животных, относящихся к высшим классам. Эти теории включают дифференциацию поврежденных тканей, трасдифференцировку входящих в клон клеток - предшественниц и активацию резервных клеток-предшественниц. Исследования Young et al. и других показали, что компартменты соединительной ткани во все время постнатального развития содержат резервные клетки - предшественницы. Последовательное повторяющееся одноклеточное клонирование и исследования по сортировке клеток выявили, что эти резервные клетки - предшественницы состоят из множественных популяций клеток, включающих тканево-специфичные клетки - предшественницы, зародышевый слой потомства стволовых клеток и плюрипотентные стволовые клетки. Тканево-специфичные клетки - предшественницы демонстрируют различные способности к дифференцировке, от унипотентности (образуя один клеточный тип) до полипотентности (образуя множественные клеточные типы). Однако, все клетки - предшественницы демонстрируют конечную продолжительность жизни от 50 до 70 удвоений популяции перед программируемыми старением и смертью. Линия зародышевого слоя стволовых клеток может образовывать более широкое разнообразие клеточных типов, чем клетки - предшественницы. Индивидуальная стволовая клетка зародышевой линии может образовывать все соответствующие клетки линии зародышевого слоя (т.е. эктодерму, мезодерму или эндодерму). Плюрипотентные стволовые клетки могут давать большее разнообразие клеточных типов, чем единственная стволовая клетка зародышевой линии. Единственная плюрипотентная стволовая клетка может образовывать клетки, принадлежащие всем трем линиям зародышевых слоев. Как стволовые клетки линии зародышевого слоя, так и плюрипотентные стволовые клетки демонстрируют повышенные способности к самообновлению, далеко превосходящие продолжительность жизни клеток - предшественниц (50-70 удвоений популяции) Авторы предполагают, что активация покоящихся тканевоспецифичных клеток - предшественниц, стволовых клеток линии зародышевого слоя и/или плюрипотентных стволовых клеток может послужить потенциальным объяснением, совместно с дедифференцировкой и трансдифференцировкой процесса восстановления тканей. Сегодня исследуются несколько модельных систем для определения возможностей использования взрослых покоящихся резервных клеток - предшественниц для тканевой инженерии /62/.

Таким образом, уровень клеточного роста, т.е. суммарный белковый синтез клетки позитивно коррелирует с синтезом белков хроматина высокой мобильности. Синтез гистонов H1 связан с репликацией ДНК. Несколько теорий было предложено для объяснения феномена тканевого восстановления у амфибий и животных, относящихся к высшим классам. Эти теории включают дифференциацию поврежденных тканей, трасдифференцировку входящих в клон клеток - предшественниц и активацию резервных клеток-предшественниц.

# 11.4 Фармакогеномика

Терапевтическое применение стволовых клеток представляет новый подход к лечению нескольких генетических и дегенеративных болезней. Возникновение фармакогенетики обещает оптимальный индивидуализированный лечебный режим для широкого разнообразия медицинских условий. Это создает новую нишу в терапевтическом медицинском исследовании, фармакогеномику. Развитие этого направления требует применения существующих технологий геномики, протеомики и биоинформатики к решению различных проблем, связанных с терапевтическими применениями стволовых клеток. /2/.

Таким образом, на базе фармагенетики создано новое направление - фармагеномика.

# 11.5 Ассимитричное деление стволовых клеток

Стволовые клетки получили особенно большое значение в течение последних лет, поскольку они представляют возможные инструменты для восстановления поврежденных органов. Эти клетки найдены не только в основных регенерирующих тканях, таких, как эпителий и кровь, но также в статических тканях, таких, как нервная система и печень, где они играют центральную роль в тканевом росте и сохранении. Механизм, с помощью которого стволовые клетки поддерживают популяции высоко дифференцированных короткоживущих клеток, как кажется, включает критический баланс между альтернативными путями (судьбами): дочерние клетки либо сохраняют идентичность стволовых клеток, либо инициируют дифференциацию. Недавние исследования на низших организмах выявили регуляторный механизм ассиметричных клеточных делений стволовых клеток. В этих моделях окружение, вероятно, обеспечивает ключевые инструктивные сигналы для выбора судьбы клеток. Наше понимание сейчас распространяется на внутренние механизмы клеточной полярности, которая влияет на ассиметричные деления стволовых клеток /18/.

Таким образом, судьба стволовых клеток, т.е. сохранение ими идентичности стволовых клеток или инициация дифференцировки решается в ходе ассиметричного клеточного деления у низших организмов.

# 11.6 Генная терапия и стволовые клетки

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) являются клоногенными, негемопоэтическими стволовыми клетками, присутствующими в костном мозге, и они способны дифференцироваться во множественные мезодерального типа клеточные линии, например, остеобласты, хондроциты, эндотелиальные клетки и также немезодермального типа линии, например, нейроноподобные клетки. Несколько методов сейчас доступно для изоляции МСК, основанные на их физических и физико-химических характеристиках, например, сцеплению с пластмассами или другими внеклеточными матриксными компонентами. Из-за легкости их изоляции и их большого потенциала дифференцировки, МСК находились среди первых стволовых клеток, использовавшихся в клинике. Несколько исследований продемонстрировали возможное использование МСК в систематической трансплантации для системных болезней, локальной трансплантации для локальных тканевых дефектов, и как переносчик генов в протоколах генной терапии или для генерации транплантабельных тканей и органов в протоколах тканевого инжиниринга. Перед тем, как широко использовать их в терапии, должны быть созданы методы, позволяющие генерировать большое число клеток, не влияющие на их потенциал дифференцировки, так же, как технологии, позволяющие преодолевать иммунологическое отторжение (в случае аллогенных трансплантантов) /26/.

Последние исследования показали, что продолжительность жизни мезенхимальных стволовых клеток span может быть увеличена путем увеличения уровней экспрессии теломеразы в клетках, и тем позволяя культуре накопить большее число клеток, необходимых для терапии. Дополнительно, было показано, что, возможно, культивировать клетки в ксено - окружении без влияния на их рост и потенциал дифференцировки. В заключение, мезенхимальные стволовые клетки кажутся гипоиммуногенными, и поэтому аллогенный трансплантант из мезенхимальных стволовых клеток возможен /27/.

В последние две декады способность переносить гены в ГСК обеспечила новые инсайты в поведение индивидуальных стволовых клеток и послужила основой новых подходов к лечению различных наследственных или приобретенных заболеваний. В настоящее время перенос в ГСК был достигнут в основном с помощью модифицированных ретровирусов. В то время как основанные на ретровирусах векторы могут эффективно трансдуцировать мышиные ГСК, экстраполяция этих методов к большим млекопитающим и человеку показала в клинических испытаниях, что они ведут к очень небольшому числу маркированных генами приживленных клеток. Дополнительно, оценки in vitro с помощью прогениторных клеток были найдены обладающими низкой предсказательной силой по отношению к исходу переноса генов в стволовые клетки. Внимание быстро переместилось к развитию превосходящих и более информативных преклинических анализов в исследовании переноса генов в человеческие стволовые клетки. Ксеногенные трансплантационные модели и системы трансплантации у больших млекопитающих оказались бесценны. Развитие лучших методов для оценки протоколов человеческой генной терапии и лучшего понимания стволовых клеток и векторной биологии нашло свою кульминацию в последнем десятилетии во множественных стратегиях для улучшения эффективности переноса генов ГСК. Улучшенные векторы переноса генов, оптимизация комбинации цитокинов и включение рекомбинантных фрагментов фибронектина в течение трансдуции являются примерами новых успешных добавлений к ранним протоколам переноса, которые внесли вклад в первый несомненные клинические выгоды от генетического манипулирования с ГСК /30/.

Таким образом, введение новых генов в стволовые клетки (генная терапия) раскрывает новые возможности для регенеративной медицины.