

ОСНОВНЫЕ ИСТОЧНИКИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

**Ржанинова А.А., ведущий научный сотрудник
ФГБУ «МГНЦ» РАМН, к.б.н.**

Термин «стволовая клетка» в формальной интерпретации означает, что каждая такая клетка дает начало древу потомков, в основании ствола которого она находится. Такой результат есть следствие уникальных свойств стволовых клеток - способность к асимметричному делению. Набор типов дифференцированных клеток, которым стволовые клетки (СК) в принципе могут давать начало, ограничен полным набором нормальных клеток всех органов и тканей (у человека это около 250 разных типов дифференцированных клеток). В условиях культивирования *in vitro* СК способны превращаться только в дефинитивные клетки из того же набора. Из этого следует, что число программ нормальной дифференцировки клеток животного данного вида ограничено и жестко контролируется на генетическом уровне. Сбой в программе дифференцировки приводит к гибели клетки или ее опухолевому перерождению.

При делении каждая стволовая клетка дает начало хотя бы одной стволовой клетке. Вторая возникающая в результате деления клетка может быть тоже стволовой (в этом случае деление стволовой клетки называют симметричным), но чаще она вступает на путь дифференцировки. В процессе роста и развития организма таким образом возникают все специализированные клетки, которые формируют все ткани и органы. Однако до глубокой старости большинство тканей содержит стволовые клетки, служащие источником восстановления ткани при ее повреждении.

Приоритет открытия стволовых клеток мезенхимного происхождения принадлежит российским ученым. В частности, еще в 1926 году выдающийся отечественный гистолог А.А. Максимов отмечал, что в соединительной ткани взрослого организма на протяжении всей жизни сохраняются малодифференцированные клетки, локализующиеся вокруг мелких сосудов и приближающиеся по своей плюрипотентности к клеткам эмбриональной мезенхимы [Maximow A.A., 1926]. Результаты своих многочисленных работ по соединительной ткани и кроветворению у позвоночных А.А.Максимов изложил наиболее полно в своей классической монографии "Соединительная ткань и кроветворные ткани", помещенной в "Руководство по микроскопической анатомии", изданной Меллендорфом на немецком языке.

В курсе гистологии Заварзина и Румянцева 1946г. описаны мезенхимные камбиальные клетки, тесно связанные с эндотелиальной выстилкой и «представляющие лишь ее функциональную модификацию» [Заварзин А. А., Румянцев А. В., 1946].

В середине 1970-х гг. А.Я. Фриденштейн с сотрудниками показали, что строма гематогенной ткани костного мозга взрослых мышей и человека содержит адгезивные к пластику клетки, которые способны дифференцироваться в костную ткань [Friedenstein A.J. et al., 1974; Friedenstein A.J. et al., 1987]. Свои исследования А.Я.Фриденштейн и И.Л.Чертков обобщили в монографии «Клеточные основы кроветворения (кроветворные клетки предшественники)» [Фриденштейн А.Я., Чертков И.Л., 1977]. Впоследствии исследования из многих лабораторий мира привели к осознанию того, что кроме остеогенеза, эти клетки могут дифференцироваться в несколько типов клеток мезодермального происхождения, т.е. обладают свойством мультипотентности [Dennis J.E. et

al., 1999; Pittenger M.F. et al., 1999]. Эти мультипотентные клетки были названы мезенхимальными стволовыми клетками, а позднее получили международное общепринятое обозначение «мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки» (ММСК).

Кроме костного мозга, ММСК или ММСК-подобные клетки были выделены из множества тканей - скелетной мышцы [Williams JT et al., 1999], жировой ткани [Zuk P.A. et al., 2001], пупочного канатика [Erices A. et al., 2000], синовиальной оболочки [De Bari C. et al., 2001], периферической крови [Kuznetsov S.A. et al., 2000], пульпы зуба [Gronthos S, et al., 2000], амниотической жидкости [Prusa A.R., et al., 2003; Tsai M.S. et al., 2004], а также из эмбриональных и фетальных тканей: крови, печени, костного мозга и легкого [Noort W.A. et al., 2002; Campagnoli C. et al., 2001; Fan C.G. et al., 2005]. Таким образом, к началу 21 века был сделан вывод о нахождении ММСК в составе соединительной ткани большинства органов, как было предсказано в более ранних исследованиях на куриных эмбрионах [Young NE et al., 1995]. Однако необходимо отметить, что эти популяции функционально не эквивалентны в отношении потенциала дифференцировки, особенно в экспериментах *in vivo* [Kuznetsov S.A. et al., 1997; Phinney D.G., Prockop D.J., 2007].

Международным обществом клеточной терапии (International Society for Cellular Therapy (ISCT)) были установлены минимальные критерии, характеризующие ММСК [Horwitz E.M. et al., 2005]. Согласно определению, ММСК это группа гетерогенных клеток, адгезивных к пластику, которые могут быть выделены из костного мозга, жировой ткани, плаценты, пуповинной крови или из любых других тканей. Наименование ММСК просто характеризует мезенхимальное происхождение этих клеток и не обязательно ограничивает потенциал их дифференцировки. Поскольку

популяции стромальных клеток неоднородны и лишь небольшое их число обладает свойствами стволовых или подобных стволовым клеткам, общими для ММСК были признаны следующие критерии:

1. Адгезия к пластику в культуре *in vitro*,
2. Экспрессия поверхностных антигенов CD 105, CD73, CD90 в 95% и более клеток и отсутствие экспрессии (в 2% клеток и менее) в отношении CD45, CD34, CD14 или 11b, CD79 alpha или CD19, и HLA-DR,
3. Способность к дифференциации *in vitro* в остеобласты, адипоциты и хондробласты.

ММСК взрослого организма привлекают внимание исследователей и практических врачей по следующим причинам: (1) высокая скорость пролиферации позволяет нарастить достаточное количество клеток для трансплантации; (2) ММСК обладают способностью к дифференцировке в разные клеточные линии, т.е. могут быть применены в терапии ряда различных заболеваний. Главное достоинство ММСК, основанное на их свойствах – возможность получения трансплантата из собственных клеток пациента. В настоящее время наиболее перспективным источником ММСК для практической медицины становится жировая ткань из-за возможности получения значительного объема биопсийного материала без угрозы здоровью больного.

Стволовые клетки жировой ткани

Жировая ткань (ЖТ) – особая разновидность соединительных тканей со специальными свойствами, в которой основной объём занимают жировые клетки – адипоциты. Между адипоцитами располагаются ретикулярные и эластические волокна, гистиоциты,

лаброциты (тучные клетки). В некоторых местах рыхлой неоформленной соединительной ткани липоциты могут располагаться поодиночке среди других клеток и межклеточного вещества. На высокую обменную активность жировой ткани указывает большое количество дегидрогеназ, дегидрирующих жирные кислоты. Жировая ткань широко распространена в организме и составляет в норме около 15-20% массы тела у мужчин и порядка 20-25% – у женщин. Общая масса жировой ткани, которая составляет 10-20 кг у здорового человека, может резко изменяться при патологических состояниях. При ожирении (которым страдает в развитых странах более 32% взрослого населения) она увеличивается до 40-100 кг и более, при голодании или нервной анорексии – может снижаться до 3% нормального уровня. Аномалии содержания и распределения жировой ткани связаны с рядом генетических нарушений и эндокринных расстройств и часто служат диагностически важными признаками заболеваний [Берштейн Л.М., 1981]. В эмбриогенезе ЖТ развивается из мезенхимы; наиболее ранним предшественником адипоцитов служат малодифференцированные фибробластоподобные клетки, лежащие по ходу мелких кровеносных сосудов. Они превращаются в преадипоциты, которые прекращают деление и постепенно преобразуются в адипоциты. В ходе дифференцировки в цитоплазме преадипоцитов появляются ферменты, ответственные за синтез липидов (главным маркером этого превращения служит липопротеиновая липаза), и скопления гликогена, а позднее (к третьему месяцу внутриутробной жизни) в цитоплазме образуются мелкие липидные капли. В дальнейшем мелкие капли сливаются друг с другом, образуя одну крупную каплю, смещающую остальную часть цитоплазмы и ядро к периферии. Клетки утрачивают

отростки и приобретают сферическую форму; щелевые соединения между ними исчезают.

Белая жировая ткань обладает способностью динамично развиваться, увеличиваясь в объеме на протяжении всей жизни человека. Жировая ткань, помимо адипоцитов, имеет в своем составе «стромально-васкулярную фракцию» (СВФ), которая включает несколько клеточных типов - эндотелиальные, гладкомышечные и стромальные клетки, а также перициты, которые, по разным данным, претендуют на роль стволовых и прогениторных популяций, обладающих свойством мультипотентности. Все эти клеточные типы могут быть выделены из жировой ткани (чаще всего из липоасpirата) в тех же условиях, что и ММСК из костного мозга. На ранних этапах пассирования в составе СВФ регистрируются клетки, несущие маркеры гемопоэтических СК (CD34, митохондриальный ALDH, ABCG2), которые в комбинации с CD31 и CD144 характеризуют эндотелиальные прогениторные популяции. Как показали Storms и соавт. и Fallon и соавт., процент таких клеток в составе не пассированных СВФ выше, чем в нефракционированном костном мозге [Storms R.W. et al., 1999; Fallon P. et al., 2003]. Кроме того, эксперименты Martinez-Estrada свидетельствуют о том, что СВФ на 0-2 пассажах содержат популяции, экспрессирующие Flk-1 (рецептор VEGF) - самый ранний известный маркер клеток эндотелиального происхождения [Martinez-Estrada O.M. et al., 2005]. Хотя число Flk-1(+) клеток в выделенных СВФ было невелико, культивирование в среде без добавления сыворотки приводило к обогащению им культур. Методика культивирования без сыворотки позволила авторам размножить 3D- структуры (3DCC), которые морфологически напоминали незрелые эндотелиальные клетки и экспрессировали FLK-1 с высокой эффективностью. Дальнейшая дифференцировка таких популяций приводила к созреванию функционально

компетентного эндотелия, что определяли по образованию трубчатых сетей HUVEC. Однако при культивировании СВФ в условиях, используемых при выделении МСК, популяции гемопоэтических и эндотелиальных прогениторов значительно сокращаются с каждым пассажем и после 4х пассажей достоверно не регистрируются [Mitchell J.B. et al., 2006]. На ранних стадиях изоляции клетки СВФ демонстрируют низкий уровень экспрессии стромальных маркеров (CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166), который прогрессивно возрастает с увеличением времени пассирования. После 4-5 пассажей, по данным литературы, популяция стромальных клеток достигает 90% и более [Mitchell J.B. et al., 2006]. Культуры стромальных фибробластоподобных клеток содержат до 10 - 30% клеток, способных образовывать колонии и дифференцироваться в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлении [Zuk P.A. et al., 2002; Zuk P.A. et al., 2001]. Таким образом, ЖТ является источником, по крайней мере двух или более популяций стволовых и прогениторных клеток, различающихся по свойствам и потенциалу. Необходимо отметить, что процесс культивирования, старения (в том числе, преждевременного) и, возможно, трансформации гетерогенных клеточных популяций остается до настоящего времени не изученным.

Способы культивирования стволовых популяций ММСК

ММСК из костного мозга взрослого организма считаются большей частью покоящимися, и насколько активно размножаются они *in vivo* – неизвестно. Начальный процесс размножения связан с активностью колониеобразующих единиц (единичные клетки, которые могут при делении образовывать дочерние клеточные колонии). Несмотря на то, что ММСК в костном мозге, вероятно, пребывают в состоянии покоя, при вступлении в

клеточный цикл они могут делиться весьма быстро, что лучше всего видно при очень малой плотности посева. Плотность посева клеток играет ключевую роль в пролиферативной способности ММСК. Наиболее высокий уровень пролиферации ММСК может быть достигнут при посеве в низкой плотности [Colter D.C. et al., 2000]. Однако не все выделенные колонии ММСК мультипотентны. По данным разных авторов около трети прикрепленных колонии ММСК плюрипотентны (костно/жиро/хрящевой потенциал), а остальные клоны могут дифференцироваться в два (костный и хондрогенный) или даже один (костный) тип клеток. [Pittenger M.F. et al., 1999; Muraglia A. et al., 2000]. Результаты исследования условно иммортализованных клонов также свидетельствуют, что клонированные ММСК гетерогенны в своих потенциалах развития [Osyczka A.M. et al., 2000; Dormady S.P. et al., 2001]. Различия в потенциалах дифференцировки и пролиферации в популяции ММСК взрослого организма могут быть объяснены тем, что, например, в костном мозге популяция ММСК представляет собой смесь собственно мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, а также множества предшественников и более зрелых клеток с разной степенью мультипотентности. Способность к пролиферации падает у клеток, которые более дифференцированы в каком-то направлении. При росте в культуре мультипотентные ММСК в конце концов теряются, поскольку их доля в популяции изначально мала по сравнению с более дифференцированными предшественниками. Таким образом, возникает вопрос, можно ли поддерживать популяцию мультипотентных ММСК при клеточной экспансии *in vitro*.

Среди возможных способов поддержания мультипотентности ММСК можно выделить культивирование с добавлением специфических факторов роста, сортировку клеток по определенному набору маркеров

перед посевом или выращивание в суспензии [Tondreau T. et al., 2004]. Однако стандартная стратегия заключается в выделении фракции ядросодержащих клеток, среди которых содержатся ММСК, и их посев со стандартной плотностью на чашки для клеточных культур в минимальной среде с эмбриональной телячьей сывороткой. Через 24 - 48 часов не прикрепившиеся клетки удаляют, а прикрепленные культивируют и пассируют, чтобы увеличить выход ММСК. Добавление факторов роста может влиять на соотношение различных клеточных субпопуляций в культуре ММСК [Jiang Y. et al., 2002; Bianchi G. et al., 2003]. Наиболее эффективно зарекомендовало себя добавление фактора роста фибробластов (bFGF): культивирование ММСК в среде с 10% ЭТС приводит к значительному возрастанию числа делений клеток без признаков старения при сохранении потенциала дифференциации [Riekstina U. et al., 2008]. Возрастание доли исходной популяции клеток с более широким потенциалом (например, квадри - против бипотентных) также может увеличить продолжительность репликативной жизни клеток в культуре. Для этого был предложен ряд методов: физический отбор клеток по их размеру, селекция на основе посевных свойств (низкие или высокие плотности посева) [Colter D.C. et al., 2000; Sekiya I. et al., 2002], селекция по поверхностным маркерам [Gronthos S. et al., 2003]. Результаты применения этих методов неоднозначны, их воспроизводимость и эффективность окончательно не доказаны.

ММСК могут быть выращены в суспензионной культуре; необходимым условием является добавление коктейля из цитокинов и перемешивание суспензии [Baksh D. et al., 2003]. Клетки, полученные в подобных суспензионных условиях, сохраняют способность дифференцироваться в клетки соединительных тканей, однако ростовые

характеристики такой культуры не высоки. Методы суспензионного культивирования клеток, зависящих от субстрата *in vitro*, являются скорее селективными, и не позволяют критично увеличить клеточную массу. С другой стороны, суспензионное культивирование дает возможность более глубоко исследовать биологию ММСК или каких-либо других клеток ранней стадии дифференцировки.

Регуляция дифференцировки ММСК

До сих пор окончательно не исследованы молекулярные механизмы, управляющие дифференцировкой ММСК.

Baksh и коллеги предложили двухстадийную модель дифференциации ММСК [Baksh D. et al., 2003]: стволовых клеток и клеток, идущих по пути дифференциации. На стадии стволовых клеток ММСК происходит асимметричное клеточное деление, в результате чего образуются две клетки, одна из которых сохраняет стволовую функцию, а вторая вступает на путь дифференциации в виде плюрипотентного предшественника. Деление происходит при наличии какого-либо стимула (фактора роста), так как обычно ММСК в подавляющем большинстве пребывают в состоянии G0/G1 блока. Клетка - предшественник проходит ряд симметричных делений, в результате чего образуется набор три - и бипотентных предшественников. Весь процесс деления не сопровождается фенотипическими изменениями, и поэтому эти этапы объединяют в стадию стволовых клеток. Деление поздних бипотентных предшественников, в результате которого появляются унипотентные предшественники, знаменует переход в стадию клеток, идущих по пути дифференциации, так как на этом этапе унипотентные предшественники приобретают некоторые фенотипические характеристики клеток того типа, в который они дифференцируются. Наконец, унипотентные предшественники становятся источниками полностью дифференцированных

клеток. Один из наиболее изученных примеров - каскад процессов, ведущих к остеобластной дифференциации. Асимметричное деление ММСК в процессе остеогенеза дает начало раннему остеопредшественнику, который в свою очередь, двигаясь по пути дифференциации, преобразуется в позднего остеопредшественника, преостеобласт, остеобласт и, в конечном итоге, в остеоцит [Song L. et al, 2004]. Все эти преобразования сопровождаются активацией и последующим выключением целого ряда факторов транскрипции (Cbfa1/Runx2, Msx2, Dlx5, Osx) и экспрессией остеоспецифичных маркеров: остеопонтина, коллагена I типа, щелочной фосфатазы, костного сиалопротеина и остеокальцина [Harada S., Rodan G.A.,2003; Madras N. et al., 2002]. Нарушение этого контролируемого во времени процесса приводит к задержкам в дифференциации и, в результате, к невозможности получения функционально полноценных остеобластов.

Гипотеза существования «мезенхимальных стволовых клеток», сформулированная еще в конце 20 столетия [Caplan A, 1991; Pittenger et al., 1999], опирается непосредственно на базис знаний, полученных в работах Фриденштейна и коллег о развитии клоногенных стромальных клеток костного мозга в скелетные ткани. Однако в процессе накопления информации о постнатальных стволовых клетках соединительных тканей появилась и другая идея, которая гласит, что предполагаемые «мезенхимальные стволовые клетки» являются общими прародителями всех негемопоэтических производных мезодермы, а не только скелетных тканей и хотя они были обнаружены в костном мозге, орган происхождения не является уникальным. Развитие скелетных и мышечных тканей в эмбриогенезе не предполагает наличия общего предшественника и существование постнатальных клеток с одновременно мышечным и скелетным потенциалом не может быть объяснено с точки зрения биологии

развития. К тому же существование различных предшественников мышечных и скелетных тканей подтверждается многими попытками индукции миогенной дифференцировки ММСК в культуре, часть из которых оказались неудачными или не достаточно эффективными [Martin-Rendon E. et al., 2008]. Анализ литературы по данной тематике не позволяет понять теоретических основ такой дифференцировки для культур любых ММСК, соответствующих установленным минимальным критериям. С другой стороны, публикации, в которых показана миогенная дифференцировка ММСК, имеются и их не мало. Наибольшая часть работ посвящена формированию из ММСК кардиомиоцитов. В частности, для ММСК показана направленная дифференцировка в кардиомиобласты ДНК-деметилирующими агентами (5-азацитидин), сокультивированием и добавлением кардиомиогенных дифференцирующих сред [Shim W.S. et al., 2004; Makino S. et al., 1999; Iijima Y. et al., 2003]. При сокультивировании ММСК с кардиомиоцитами и добавлением среды, кондиционированной кардиомиоцитами, было показано, что для реализации процесса миогенной дифференцировки необходим прямой контакт клетка-клетка, а присутствие цитоиндукторов не является достаточным условием [Wang T. et al., 2006]. Эта идея получила развитие в более поздней работе Choi Y.S. и соавт., выполненной на ММСК из жировой ткани [Choi Y.S. et al., 2010]. Makino и коллеги показали, что при обработке культур клеток ММСК из костного мозга 5-азацитидином изменялась морфология 30% клеток [Iijima Y. et al., 2003]. Они сливались, образуя миотубоподобные структуры через неделю, начинали спонтанно сокращаться через 2 недели и синхронно сокращались через 3 недели. Образовавшиеся структуры положительно метились антителами против миозина, десмина и актина.

Спонтанная дифференцировка ММСК из немышечных тканей в клетки скелетных мышц в литературе не описана. Это наводит на мысль, что к миодифференцировке способны не все, а лишь определенная часть популяций ММСК, для которых миогенный путь развития является преимущественным.

Тесты *in vitro*, основанные на воздействии на культивируемые клетки искусственных сигналов дифференцировки, а затем выявление специфических маркеров, не имеют строгого соответствия с гистологической картиной, наблюдаемой в ткани при дифференциации клеток в естественных условиях. С другой стороны используются способы, цель которых показать спонтанное перепрограммирование судьбы клетки под действием случайного набора факторов, присутствующих в среде. Оба способа изменения программы клетки являются в равной степени важными биологическими характеристиками клетки и все же они радикально отличаются как концептуально, так и экспериментально. В каждом случае принципиально важно, является ли вводимый индуктор специфическим химическим сигналом, запускающим перепрограммирование судьбы клетки или эффект от его воздействия связан со спонтанной дифференцировкой из-за неоптимальных ростовых условий опытной культуры. Возможность спонтанной дифференцировки является характеристикой данной культуры и представляет собой развитие клетки в пределах дифферона, а не перепрограммирование ее судьбы.

Принятый ранее взгляд на дифференциацию как на ряд последовательных клеточных преобразований на пути к терминально дифференцированной клетке был подвергнут пересмотру, поскольку стволовые клетки взрослого организма оказались способны в определенных условиях дифференцироваться в клеточные типы, отличные от тех, что

встречались в тканях, из которых эти клетки были выделены [La Barge M.A., Blau H.M., 2002; Zhao L.R. et al., 2002]. К примеру, было показано, что терминально дифференцированные хондроциты, остеобласты и адипоциты под воздействием внеклеточных стимулов могут менять свои фенотипы на фенотипы других мезенхимальных типов клеток *in vitro*. В процессе трансдифференциации, дифференцированные клетки теряют фенотипические свойства, характерные для их клеточного типа, и активно пролиферируют, становясь похожими морфологически и функционально на примитивные стволовые клетки. В определенных условиях эти дедифференцированные клетки могут развиваться в другой тип клеток, то есть пройти повторную дифференциацию. Следовательно, по мнению авторов, и предшественники, и терминально дифференцированные клетки сохраняют полипотентность, и в соответствующих условиях (например, в процессе регенерации тканей) могут использовать ее для изменения путей дифференциации.

ММСК в определенных индуцирующих условиях способны дифференцироваться не только в мезодермальные типы клеток, но и давать начало производным других зародышевых листков – эктодермы и эндодермы. В последние годы опубликовано несколько первых работ, демонстрирующих возможность использования ММСК из костного мозга в качестве источника получения инсулин-продуцирующих клеток, в том числе аутологичных [Karnieli O. et al., 2007; Li Y. et al., 2007]. Для трансдетерминации ММСК в предшественники эндодермы и последующей дифференцировки используются методы культивирования в специальных средах, содержащих индукторы [Hisanaga E. et al., 2008] и трансфекции генами ключевых факторов транскрипции (*Foxa2*, *Hb9*, *Pdx1*) [Moriscot C. et al., 2005]. Полученные таким образом инсулин-продуцирующие клетки функционально активны и демонстрируют глюкозо-зависимую секрецию

инсулина как *in vitro* так и *in vivo* [Chen L.B. et al., 2004]. Результаты подобных работ, выполненных на ММСК из жировой ткани, менее оптимистичны. Кажиуама с соавт. трансфицировали ММСК геном *Pdx1* с помощью ретровирусной доставки, а затем дифференцировали добавлением в среду культивирования различных индукторов. Экспрессию инсулина им получить не удалось, однако ММСК жировой ткани, экспрессирующие *Pdx1*, снижали уровень гипергликемии у крыс с моделированным сахарным диабетом [Kajiyaма H. et al., 2010]. Причина нормализации состояния животных не ясна. Предположительно, эффект достигается за счет трофического воздействия трансплантированных ММСК.

Стволовые клетки сосудистой стенки. ММСК и перициты

Перициты сосудистой стенки. Строение и функции

Согласно классическим представлениям гистологии перициты, или клетки Ружэ или пристенные клетки (mural cells) кровеносных сосудов - это малодифференцированные отростчатые клетки соединительной ткани которые являются элементами стенок венул и кровеносных капилляров. Впервые перициты были описаны французским анатомом и физиологом Ружэ в 1873 г [Rouget C., 1873], а термин «клетка Руже» и «перицит» впервые ввел в употребление германский анатом и гистолог Карл Вильгельм Циммерман (Karl Wilhelm Zimmermann) в 1923г. [Zimmerman K., 1923]. Местом локализации перицитов является наружная стенка кровеносных капилляров и мелких венул [Andreeva E.R., 1998]. Эти клетки чаще всего расположены на ретикулярной пластинке, матрикс которой синтезируется самими перицитами. Ретикулярная пластинка непосредственно прилегает к наружному слою двухслойной основной пластинки, синтезируемой клетками

эндотелия. Вместе двухслойная основная пластинка и ретикулярная пластинка составляют основную (базальную) мембрану. Таким образом, эндотелиоциты и перициты чаще всего расположены с разных сторон единой основы - основной (базальной) мембраны. Наиболее часто перициты локализуются на наружной поверхности стенки кровеносного сосуда (extramural pericyte), реже наблюдают перициты, расположенные внутри стенки кровеносного сосуда (intramural pericyte) [Ashton N. and de Oliveira F., 1966] . В среднем, длина клетки составляет ~20 мкм, толщина ~0,5 мкм. Перициты имеют вытянутую форму, характерное выпуклое ядро, которое выдается кнаружи от кровеносного капилляра и многочисленные отростки (Рисунок 1.1). Между перицитами капилляров и прекапиллярных венул имеются широкие межклеточные пространства [Iijima T, Zhang JQ, 2002]. Тело перицита всегда вытянуто вдоль направления кровотока. Первичные длинные отростки расположены вдоль длинной оси капилляра. Короткие вторичные отростки опоясывают капилляры и образуют плотные соединения с эндотелиоцитами. Эти соединения (нексусы) обеспечивают непосредственное взаимодействие цитоплазмы перицитов и эндотелиоцитов для обмена веществами. Отростки перицитов могут простираются на соседние кровеносные капилляры. Одно время полагали, что перициты это сократительные клетки, подобные гладкомышечным клеткам, но теперь принято считать, что перициты сами по себе не обладают сократимостью, но способны дифференцироваться в гладкомышечную клетку. При необходимости перициты могут развиваться в эндотелиальные клетки стенок артериол и венул, макрофаги и другие специализированные клетки [Collett GD, Canfield AE., 2005; Alliot-Licht B et al., 2005]. В связи с особенностями структуры, перициты могут выполнять функции, связанные с регулированием кровотока по капиллярам, с ангиогенезом, с фагоцитозом и

другими процессами [Díaz-Flores L. et al., 2009]. Кроме того, перициты одной локализации могут происходить от разных предшественников и различаться по экспрессии специфических маркеров. Например, в работе Lamagna C. и Bergers G. на модели васкуляризации опухоли было показано, что под воздействием цитокинов, выделяемых опухолями вызывается каскад событий, ведущих к мобилизации предшественников перицитов в костном мозге и их направленной миграции в сосудистую сеть опухоли или место повреждения ткани [Lamagna C., Bergers G., 2006]. Авторы обнаружили, по крайней мере, две различные популяции клеток костного мозга, дающие начало перицитам опухоли: PDGFR⁻ / SCA-1⁺ / CD11b⁻ популяции дифференцировались в зрелые перициты фенотипа NG2⁺ / SMA⁺ / Desmin⁺, тогда как CD45⁺ / CD11b⁺ популяции клеток развивались в перициты, экспрессирующие только NG2 [Rajantie I., 2004].

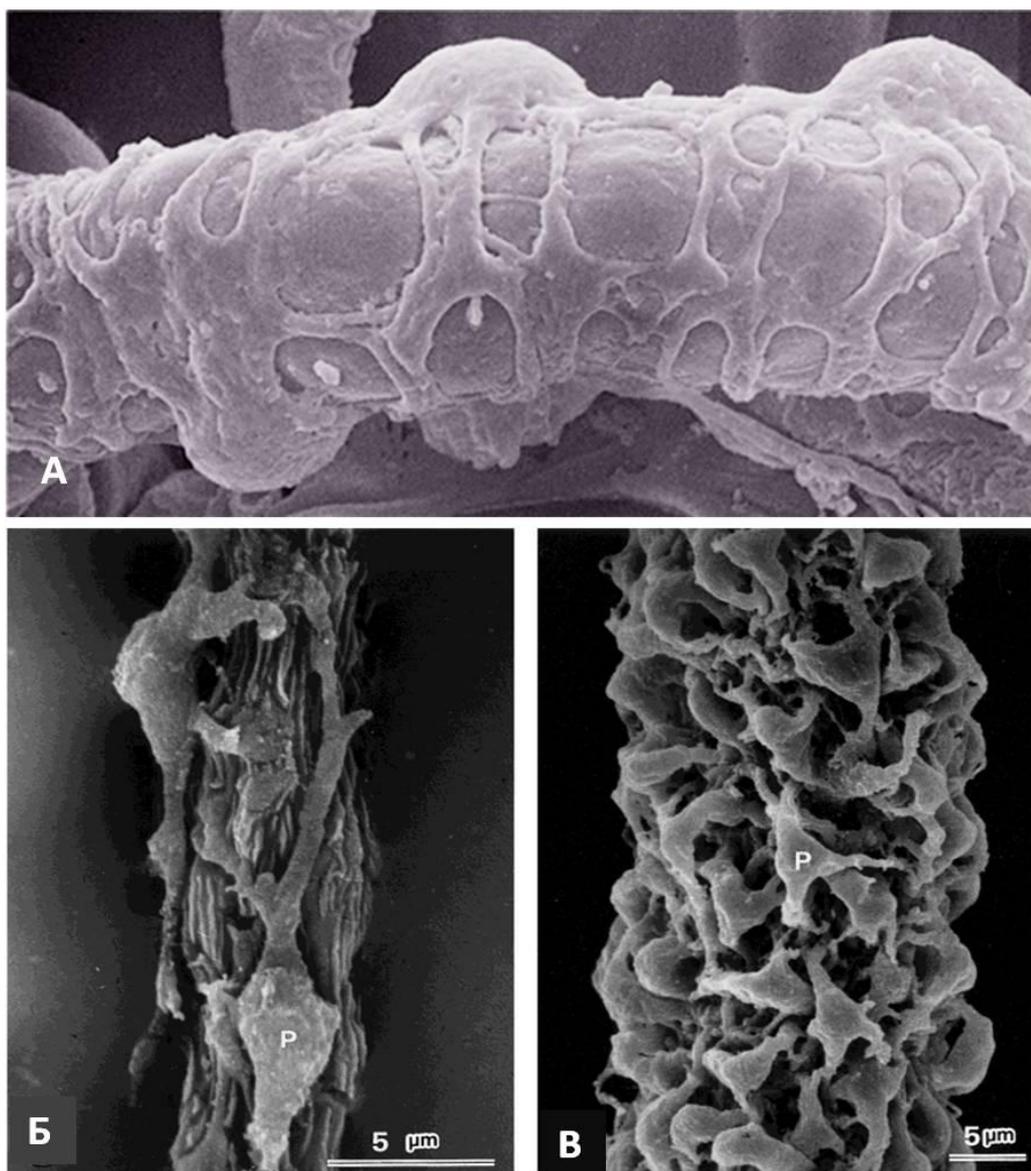


Рисунок 1.1. Микрофотографии, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа: (А) капилляр крысы ($\times 5000$) [Fujiwara T, Uehara Y, 1984]; (Б) капилляр и (В) посткапиллярная венула пульпы зуба собаки [Iijima T, Zhang JQ, 2002]. Перициты на фотографиях внизу обозначены буквой «Р».

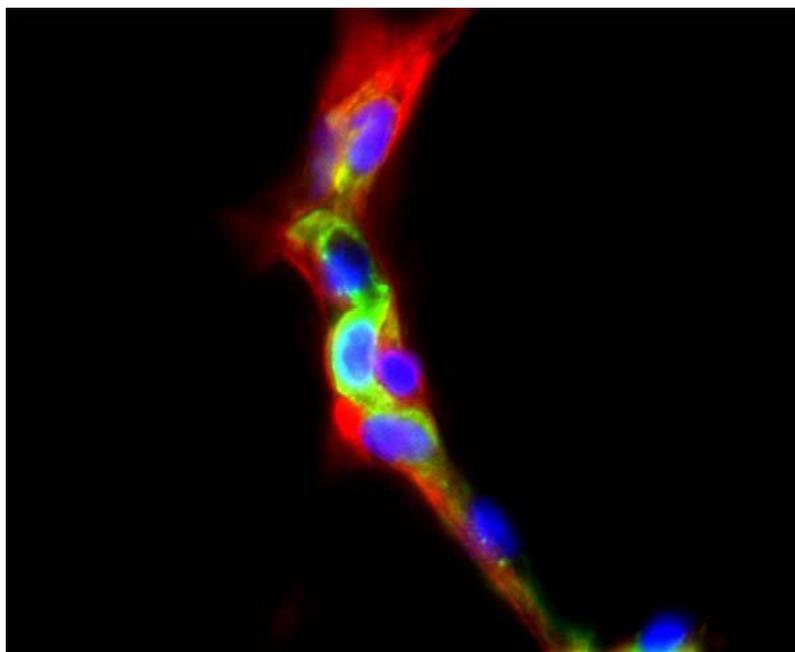
Перициты взаимодействуют с более дифференцированными гладкомышечными клетками (ГМК) стенки артериол. В отличие от ГМК, они полностью встроены в базальную мембрану капилляров и

непосредственно участвуют в процессе роста и функционального развития микроциркуляторного русла [Allt G., Lawrenson J.G., 2001; Bergers G., Song S., 2005]. Характерной общей чертой перицитов и ГМК является их сократительный (контрактильный) фенотип. Тем не менее, содержание актина и миозина неравномерно распределено в популяции перицитов, что приводит к различиям в их сократительной способности в зависимости от локализации клеток в рамках капиллярного русла [Nehls V. and Drenckhahn D., 1991; Joyce N.C. et al., 1985]. Перициты могут контролировать пролиферацию эндотелиальных клеток и процесс ангиогенеза, как при физиологических, так и при патологических состояниях [Song S. et al., 2005; Ribatti D., et al., 2011].

Маркеры перицитов

Известными маркерами перицитов являются гладкомышечный актин (α SMA), десмин, протеогликан NG2, рецептор тромбоцитарного фактора роста PDGFB-R (CD140b), аминопептидаза N, и регулятор G сигнализации 5 (RGS-5). Однако ни одного из них не достаточно, чтобы идентифицировать 100% перицитов [Ozerdem U. et al., 2002; Crisan M. et al., 2011; Ribatti D. et al., 2011; Song S. et al., 2005]. К примеру, Nehls V. и Drenckhahn D. показали, что у перицитов истинных капилляров (midcapillaries), отсутствуют изоформы гладкомышечного α -актина (α SMA) в то время как переходные перициты пре- и посткапиллярных микрососудистых сегментов экспрессируют изоформы α SMA. Как предположили авторы, это связано с различиями функций перицитов разных сегментов кровеносных сосудов [Nehls V. and Drenckhahn D., 1991].

Большинство перицитов человека экспрессируют маркер CD146 (Mel-CAM, S-endo, MUC-18), который также представлен на поверхности некоторых эндотелиальных клеток [Li Q. et al., 2003]. С помощью иммуногистохимического анализа было показано, что во всех исследованных тканях человека, включая скелетную мышцу, миокард, поджелудочную железу, костный мозг, брюшной жир, плаценту, головной мозг и многие другие органы и ткани, присутствуют клетки сосудистой стенки, несущие этот антиген. В отличие от эндотелиальных клеток перициты не экспрессируют маркеры CD31, CD34, CD144, vW (фактор фон Виллебранда) и Ulex europaeus лиганд (Рисунок 1.2) [Crisan M. et al., 2008; Chen C.W. et al.,



2009].

Рисунок 1.2. Продольный разрез капилляра белой жировой ткани человека. Эндотелиальные клетки (CD34, зеленый) плотно окружены перицитами (CD146, красный). Ядра окрашены DAPI (синий) [Chen C.W. et al., 2009].

Кроме эндотелиоцитов и перицитов CD146 экспрессируется шванновскими клетками и клетками некоторых опухолей, в числе которых меланома и, частично, неоплазии мезенхимального происхождения. В

отличие от меланоцитов, на поверхности которых CD146 в норме отсутствует и появляется только при злокачественном перерождении, на опухолевых клетках из мезенхимы он является тканеспецифичным маркером [Shin I-M. et al., 1994; Shin I-M. et al., 1999]. Таким образом, Mel-CAM в 100% случаев маркирует как доброкачественные, так и злокачественные опухоли из перицитов (гемангиоперицитомы), гладких миоцитов (лейомиомы и лейомиосаркомы), эндотелия (гемангиомы и ангиосаркомы) и шванновских клеток (шванномы и нейрофибромы). В то же время фибросаркомы, липосаркомы или синовиальные саркомы всегда CD146 – негативны [Shin I-M. et al., 1999].

Взаимосвязь между ММСК и перицитами

Независимо от тканевого происхождения выделенные перициты могут быть культивированы *in vitro*. Перициты имеют миогенный потенциал в культуре и *in vivo*, а также способны дифференцироваться в кость, хрящ и жировые клетки подобно ММСК (Рисунок 1.3) [Crisan M. et al., 2008]. Показано, что перициты экспрессируют все основные маркеры ММСК, включая CD44, CD73, CD90 и CD105, а также обладают иммуносупрессивным свойством, подтвержденным в клинических исследованиях на пациентах [Le Blanc K., Ringden O., 2007]. Все проведенные исследования позволили предположить наличие прямой связи между ММСК и перицитами. Кроме того, ММСК, выделенные из эндометрия человека, ко-экспрессировали CD146 и PDGF-Rb [Schwab K.E. and Gargett S.E., 2007]. Эти популяции обладали более высокой колониобразующей способностью по сравнению с CD146-/ PDGF-Rb-. Показано, что ММСК в жировой ткани локализованы в сосудистой стенке и также несут маркеры перицитов [Cai X. et al., 2011]. Gronthos S. и Zannettino A.C. предложили метод изоляции клоногенных ММСК из жировой ткани взрослого человека

на основе клеточного сортирования популяций, несущих маркеры перицитов [Gronthos S., Zannettino A.C., 2011].

Эффективность выделения популяций ММСК с фенотипом $CD146^+$ в значительной степени зависит от ферментного состава раствора, используемого для дезагрегации ткани. Schugar R.C. и соавт. выделяли ММСК из пупочного канатика – ткани, наиболее обогащенной ММСК периваскулярного фенотипа. Использование диспазы для диссоциации ткани позволило авторам значительно увеличить выход клеток сосудистой стенки (эндотелия и перицитов), в то время как $CD146^-$ ММСК пуповинного матрикса наиболее эффективно выделялись в растворе коллагеназы [Schugar R.C. et al., 2009]. Это исследование, кроме того, наглядно показывает существование нативных ММСК двух фенотипов, которые одновременно могут быть изолированы из одного органа или ткани.

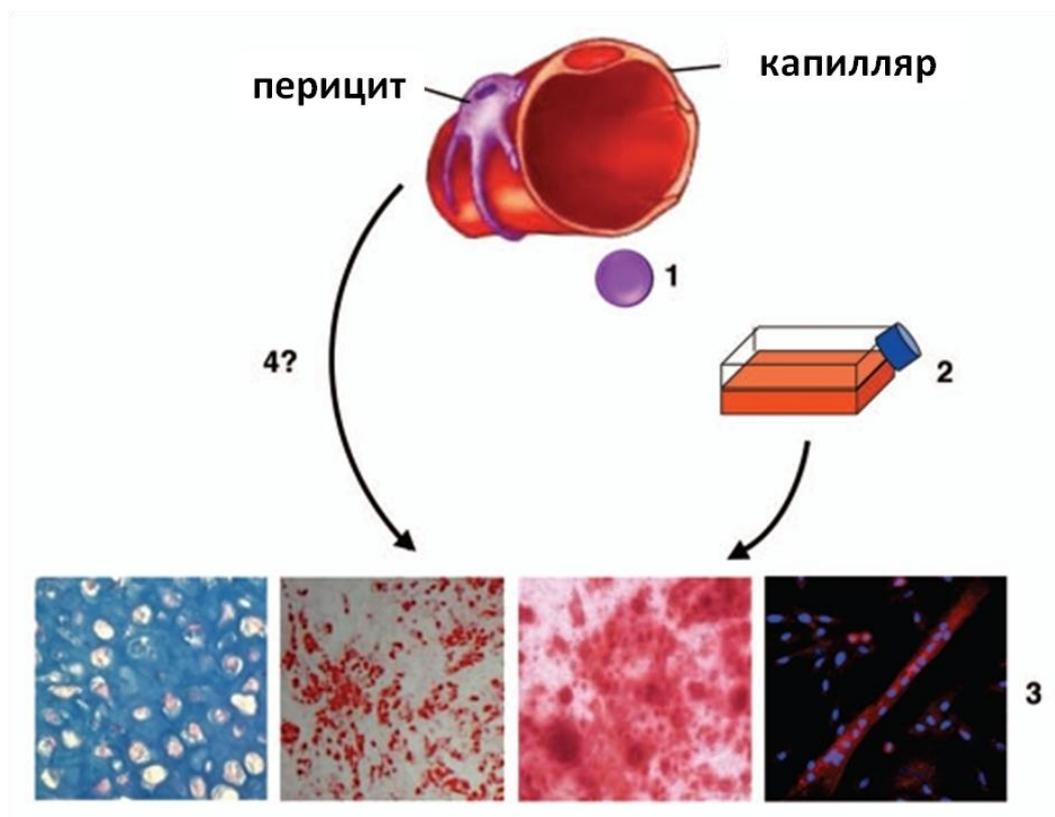


Рисунок 1.3. Пре- и постнатальные перициты, выделенные из стенки сосудов (1) и культивированные (2), дифференцируются в хрящ, жир, кость и скелетную мышцу (3, слева направо). Используется ли этот потенциал развития в естественных условиях в эмбриогенезе и в процессах регенерации взрослых тканей, до сих пор не ясно (4) [Crisan M. et al., 2011].

В настоящее время большое внимание уделяется ММСК, поскольку они обладают терапевтическим потенциалом и успешно используются во многих клинических исследованиях. Возможно, клинический успех во многом обусловлен присутствием перицитов как наиболее ранней и пластичной фракции. Недавно была обнаружена субпопуляция периваскулярных ММСК в скелетной мышце человека («миоэндотелиальные клетки»), способствующая восстановлению сердечной функции после инфаркта миокарда более эффективно, чем миобласты и эндотелиальные клетки, стимулируя ангиогенез и уменьшая количество рубцовой ткани [Paquet-Fifield S. et al., 2009; Sarugaser R et al., 2009]. Миоэндотелиальные клетки секретируют большие количества основного ангиогенного фактора VEGF [Sarugaser R. et al., 2009].

Трансплантация культивированных человеческих перицитов CD146^{high} CD34⁻ CD45⁻ CD56⁻ в сердце мыши с моделированным инфарктом привела к индукции ангиогенеза и, как следствие, к увеличению капиллярной плотности и уменьшению фиброза. Перициты, возможно, также могут использоваться для оказания терапевтического эффекта при лечении сердечной недостаточности [Zannettino A, Gronthos S., 2009; Lindvall O., Kokaia Z., 2006; Kumar V. et al., 2004].

Несмотря на то, что ММСК способны к дифференцировке в различных направлениях *in vitro*, они обладают низкой способностью к миграции в поврежденную ткань, пролиферации и дифференцировке в

нужном направлении на моделях *in vivo* [Hansel D.E., Dintzis R.Z., 2006]. Однако, терапевтический эффект может также достигаться за счет экспрессии различных паракринных факторов роста или цитокинов. Было показано, что в супернатантах перицитов, выделенных из мышцы человека, культивированных от 1 до 10 пассажей обнаружены гепарин-связывающий эпидермальный фактор роста (HB-EGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF), тромбоцитарный фактор роста-B (PDGF-BB), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста кератиноцитов (KGF), ангиопоэтин 2 (ANG2) и тромбопоэтин (TPO). Известно, что все эти факторы роста способны стимулировать репарацию тканей *in vivo*. HB-EGF - митогенная и хемотаксическая молекула, которая участвует в репарации тканей, а также ангиогенезе и фиброгенезе [Wallace G.Q. et al., 2009]. Показано, что экспрессия HB-EGF в перицитах в 10-20, а bFGF и KGF в 3-7 раз больше, чем в ММСК из жировой ткани или пуповинной крови.

Результаты экспериментов, полученные в нескольких лабораториях, показывают наличие общих черт между стандартными ММСК и перицитами. Перициты, полученные из разных органов человека, при культивировании образуют отличные ММСК (Рисунок 1.4).

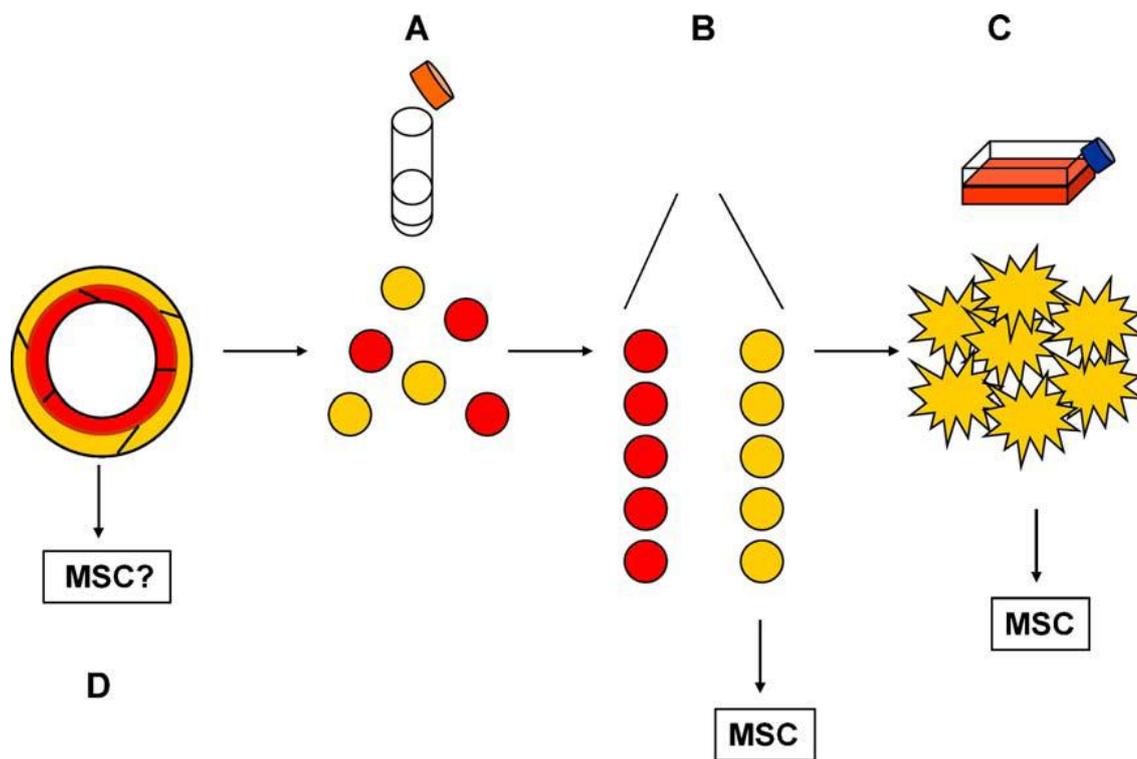


Рисунок 1.4. Схема, иллюстрирующая происхождение ММСК из перицитов. (А) Перициты (обозначены желтым) отделены от эндотелиальных клеток (обозначены красным) и очищены до гомогенной культуры методом клеточного сортирования (В). Отсортированные первичные перициты способны к мультипотентной дифференцировке (В) дают начало аутентичным ММСК в культуре (С). Вопрос о том, играют ли нативные перициты роль мультипотентных прогениторных клеток *in situ*, остается открытым (D) [Chen C.W. et al., 2009].

Стандартно полученные ММСК, введенные в глиобластому крысы мигрировали вокруг кровеносных сосудов и становились типичными перицитами, экспрессирующими α -SMA, PDGF-Rb и NG2, и негативными по эндотелиальным маркерам. Данное исследование также может свидетельствовать о периваскулярном происхождении ММСК [Piepoli M.F. et al., 2009]. Некультивированные перициты, введенные в травмированную мышцу непосредственно после флуоресцентного сортирования приобретают миогенный потенциал. Это подтверждает тот факт, что перициты приобретают свойства ММСК не при культивировании, а сами по себе

являются мультипотентными [Guttermann D.D. et al., 1999]. Перicyты секретируют разнообразные факторы роста HB-EGF, VEGF, bFGF, KGF, PDGF-BB и TPO, поэтому они могут играть значительную роль в доставке трофических факторов [Fraser JK et al., 2004], ангиогенезе [Pe'ault B. et al., 2007], поддержании гемопозза и регенерации ткани [Mazhari R. et al., 2007].

Адвентициальная оболочка сосудов как альтернативный источник

ММСК

В течение долгого времени адвентициальная оболочка кровеносных сосудов рассматривалась как неактивный компонент кровеносных сосудов, основной функцией которой является структурная поддержка средняя оболочка. Только недавно было показано, что адвентиция играет важную роль в ремоделировании сосудов и развитии сосудистых заболеваний, таких как, например, атеросклероз [Sartore S. et al., 2001; Wilcox J.N. et al., 1996; Guttermann D.D. et al., 1999]. Адвентициальные клетки могут активироваться в ответ на повреждение [Siow R.C. et al., 2003; Li G. et al., 2000; Faggin E. et al., 1999], возникновение гипоксии [Haurani M.J. et al., 2007] или гипертензии [Herrmann J. et al., 2005]. Активация прогениторных клеток адвентиции приводит к пролиферации и затем дифференциации в миофибробласты, которые мигрируют во внутренние слои сосудистой стенки и секретируют паракринные факторы, регулирующие ремоделирование сосуда [Stenmark K.R. et al., 2006]. Например, Hu и соавт. идентифицировали и изолировали в апо E- /- мышцах Sca1- адвентициальные клетки-предшественники, которые способны дифференцироваться в гладкомышечные клетки в условиях как *in vitro* так и *in vivo* [Hu Y. et al., 2004].

Потенциал дифференциации адвентициальных прогениторных клеток не ограничивается миофибробластами. Ingram и соавт. показали, что стенки

сосудов содержат клетки-предшественники эндотелия, участвующие в ангиогенезе [Ingram D.A. et al., 2005]. $CD34^+ CD31^-$ предшественники способны дифференцироваться в зрелые эндотелиальные клетки и образуют капиллярные сети, которые впоследствии локализуются в «васкулогенной зоне» между tunica media и tunica adventitia в грудной аорте [Zengin E. et al., 2006]. Как указывалось выше, было продемонстрировано, что ММСК-подобные клетки возникают из перицитов, окружающих капилляры и микрососуды [Crisan M. , et al., 2008]. Мультипотентные предшественники с фенотипом ММСК также были обнаружены в стенке артерии быка и недавно были изолированы из tunica adventitia легочной артерии человека [Hoshino A. et al., 2008].

Эти наблюдения позволяют предположить, что из клеточных популяций сосудистой стенки не только перициты капилляров и микрососудов являются предшественниками ММСК как предполагали ранее [Carlan A.I., 2008] (Рисунок 1.5). Фенотип этих адвентициальных предшественников ММСК и их потомство в культуре впервые были описаны Corselli и соавт. в 2010 г. Авторы провели эксперименты по одновременной изоляции перицитов и других клеточных популяций из стромально-вазкулярной фракции жировой ткани человека методом клеточного сортирования на основании дифференциальной экспрессии маркеров CD34, CD31 и CD146. Кроме перицитов только клетки с фенотипом $CD34^{hi}CD31^-CD146^-$ были способны давать потомство, обладающее морфологией и потенциалом дифференциации ММСК [Corselli M. et al., 2010]. Исследование иммунолокализации клеток $CD34^{hi}CD31^-CD146^-$ в нескольких человеческих органах показало, что популяции данного фенотипа находятся в адвентициальной оболочке кровеносных сосудов и, подобно перицитам, изначально экспрессируют комплекс поверхностных маркеров ММСК.

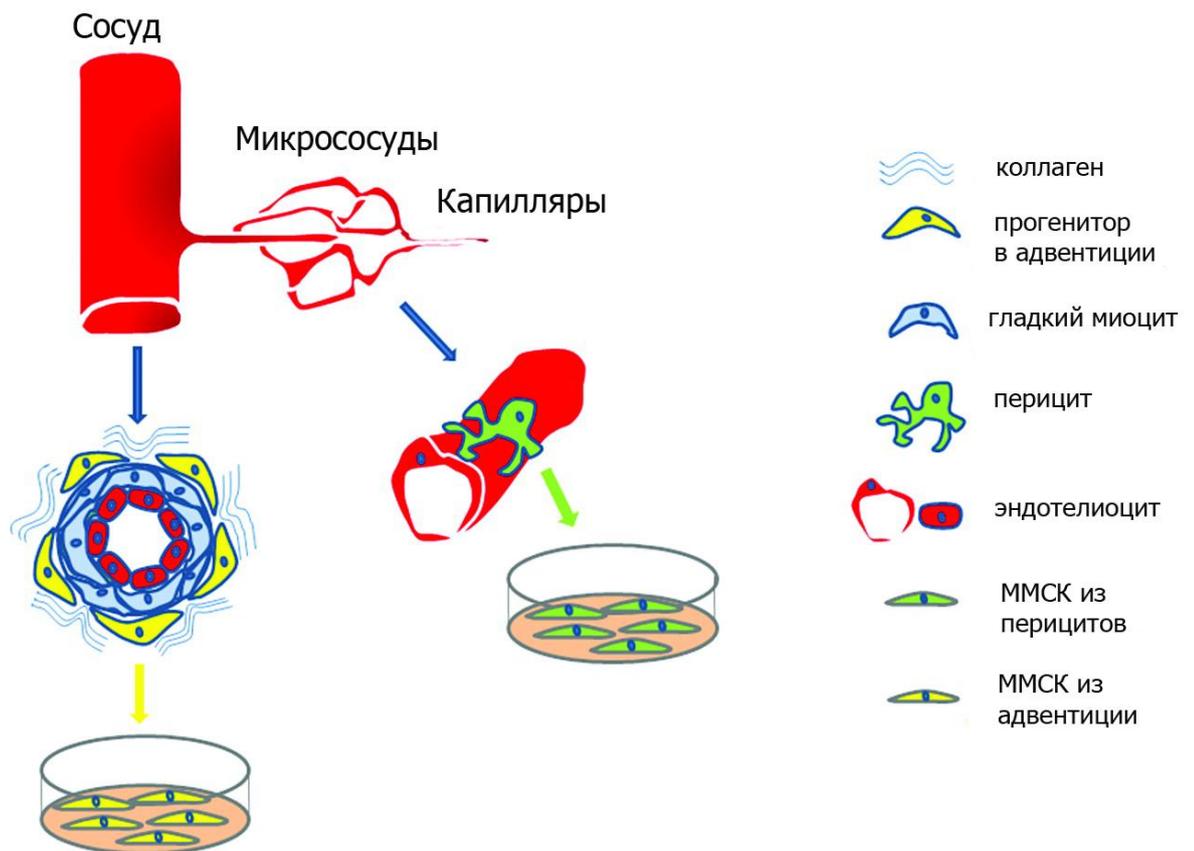


Рисунок 1.5. Две популяции периваскулярных клеток человека, дающее начало мультипотентным ММСК-подобным клеткам в культуре: перициты, окружающие капилляры и микрососуды и адвентициальные клетки, входящие в состав оболочки всех более крупных сосудов [Corselli M., et al., 2010].

Список литературы

1. Берштейн Л.М. (1981). Влияние возраста на соотношение содержания жира в теле с площадью поверхности тела. Физиология человека, 7(2): 360-362.
2. Гансбургский А.Н., Павлов А.В. (1999) Эмбриональное развитие и гистофизиология органов детей и подростков. Ярославль, изд-во. ЯГМА, 40с
3. Кузнецов С.Л., Мушкамбаров Н.Н., Горячкина В. Л. (2002) Атлас по гистологии, цитологии и эмбриологии. МИА.

4. Заридзе Д.Г. Канцерогенез (2004), Медицина:576с.
5. Полянская Г. Г., Вахтин Ю. Б. (2003) Кариотипическая структура клеточных популяций *in vitro* как целостная система. Цитология, 45(2):115-131
6. Ржанинова А.А., Горностаева С.Н., Гольдштейн Д.В., Сабурова И.Н., Репин В.С. (2003) [Мезенхимальные стволовые клетки из фетального и донорского костного мозга человека: получение и сравнительная характеристика.](#) Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. Приложение 2003: 39-43
7. Ржанинова А.А., Горностаева С.Н., Гольдштейн Д.В. (2005) Получение и фенотипическая характеристика мезенхимальных стволовых клеток из тимуса плодов человека. Клеточные технологии в биологии и медицине, 1: 34-41
8. Фриденштейн А.Я., Чертков И.Л.(1977) Клеточные основы кроветворения (кроветворные клетки предшественники). М., Медицина.
9. Alliot-Licht B, Bluteau G, Magne D, Lopex-Cazaux S, Lieubeau B, Daculsi G, et al.(2005) Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures. Cell Tissue, 321(3):391–400.
10. Allt G, Lawrenson JG. (2001) Pericytes: cell biology and pathology. Cells Tissues Organs, 169:1–11.
11. Almazan G, Vela JM, Molina-Holgado E and Guaza C. (2001) Reevaluation of nestin as a marker of oligodendrocyte lineage cells. Microsc Res Tech,52:753-765
12. Amoh Y, Li L, Yang M, et al. (2004) Nascent blood vessels in the skin arise from nestin-expressing hair-follicle cells. Proc Natl Acad Sci USA, 101: 13291-13295
13. Andreeva ER, Pugach IM, Gordon D, Orekhov AN.(1998) Continuous subendothelial network formed by pericyte-like cells in human vascular bed. Tissue Cell, 30:127–35.
14. Ashton N. and de Oliveira F. (1966) Nomenclature of pericytes. Intramural and extramural. Br J Ophthalmol., 50(3): 119–123.
15. Auerbach R. (1960) Morphogenetic interactions in the development of the mouse thymus gland. Dev Biol; 2:271-84.
16. Avnet S, Perut F, Salerno M, Sciacca L, Baldini N.(2012) Insulin receptor isoforms are differently expressed during human osteoblastogenesis. Differentiation ;83(5):242-8.
17. Baksh D., Davies J.E., Zandstra P.W.(2003) Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion. Exp. Hematol., 31: 723-732

18. Bergers G, Song S. (2005) The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro-oncology*, 7:452– 464.
19. Bianchi G., Banfi A., Mastrogiacomo M. et al. (2003) Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Exp. Cell Res.*, 287: 98-105.
20. Bockman DE. (1997) Development of the thymus. *Microsc Res Tech*; 38(3):209-15.
21. Cai X, Lin Y, Hauschka PV, Grottkau BE. (2011) Adipose stem cells originate from perivascular cells. *Biol Cell*, 103(9):435-47.
22. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S et al.(2001) Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*, 98:2396 –3402.
23. Caplan AI. (2008) All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell*, 3:229 –230.
24. Caplan AI. (1991) Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.*, 9(5):641-50.
25. Chen CW, Montelatici E, Crisan M, Corselli M, Huard J, Lazzari L, Péault B. (2009) Perivascular multi-lineage progenitor cells in human organs: regenerative units, cytokine sources or both? *Cytokine Growth Factor Rev.*, 20(5-6):429-34.
26. Chen LB, Jiang XB, Yang L.(2004) Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol*, 10(20):3016-20.
27. Choi YS, Dusting GJ, Stubbs S, Arunothayaraj S, Han XL et al. (2010) Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes. *J Cell Mol Med.*14(4):878-89.
28. Collett GD, Canfield AE. (2005) Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification. *Circ Res*, 96:930–8.
29. Colter D.C., Class R., DiGirolamo C.M., Prockop D.J. (2000) Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *PNAS USA*, 97: 3213-3218.
30. Crisan M., Corselli M., Chen C-W., Pault B.(2011) Multilineage stem cells in the adult A perivascular legacy? *Organogenesis*, 7(2):101-104.
31. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. (2008) A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, 3(3):301–13.
32. Corselli M. , Chen C-W, Crisan M, Lazzari L., Pe'ault B. (2010) Perivascular Ancestors of Adult Multipotent Stem Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 30:1104-1109.

33. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P et al. (2001) Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*, 44:1928–1942.
34. Dennis JE, Merriam A, Awadallah A et al. (1999) A quadri-potential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res*, 14:700–709.
35. Díaz-Flores L, Gutiérrez R, Madrid JF, Varela H, Valladares F, Acosta E et al. (2009) Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol Histopathol.*, 24(7):909-69.
36. Dormady S.P., Bashayan O., Dougherty R. et al. (2001) Immortalized multipotential mesenchymal cells and the hematopoietic microenvironment. *J. Hematother. Stem Cell Res*, 10: 125-140
37. Ehrmann J, Kolar Z and Mokry J. (2005) Nestin as a diagnostic and prognostic marker: immunohistochemical analysis of its expression in different tumours. *J Clin Pathol*, 58: 222-223
38. Erices A, Conget P, Minguell JJ. (2000) Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*, 109:235–242.
39. Etchevers HC, Vincent C, Le Douarin NM, Couly GF. (2001) The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. *Development*, 128:1059–1068.
40. Faggin E, Puato M, Zardo L, Franch R, Millino C, Sarinella F, Pauletto P, Sartore S, Chiavegato A. (1999) Smooth muscle-specific SM22 protein is expressed in the adventitial cells of balloon-injured rabbit carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 19:1393–1404.
41. Fallon P., Gentry T, Balber A, Boulware D, Janssen WE, Smilee R, Storms R, Smith C. (2003) Mobilized peripheral blood SSCloALDHbr cells have the phenotypic and functional properties of primitive hematopoietic cells and their number correlates with engraftment following autologoustransplantation. *Br J Haematol.*, 122(1):99-108
42. Fan CG, Tang FW, Zhang QJ et al. (2005) Characterization and neural differentiation of fetal lung mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*, 14:311–321.
43. Fraser JK, Schreiber RE, Zuk PA, Hedrick MH. (2004) Adult stem cell therapy for the heart. *Int J Biochem Cell Biol.*, 36:658–666.

44. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV.(1987) Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet.*, 20(3):263-72.
45. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV.(1974) Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation.*17(40:331-40.
46. Frojzman K, Pelliniemi LJ, Lendahl U, Virtanen I and Eriksson JE. (1997) The intermediate filament protein nestin occurs transiently in differentiating testis of rat and mouse. *Differentiation*, 61: 243-249
47. Fujiwara T, Uehara Y.(1984) The cytoarchitecture of the wall and the innervation pattern of the microvessels in the rat mammary gland: a scanning electron microscopic observation. *Am J Anat.*, 170(1):39-54.
48. Garvin AJ, Stanley WS, Bennett DD, Sullivan JL, Sens DA.(1986) The in vitro growth, heterotransplantation, and differentiation of a human rhabdomyosarcoma cell line. *Am J Pathol*; 125(1):208-17.
49. Gronthos S., Zannettino A.C., Hay S.J. et al. (2003) Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J. Cell Sci.* 2003, 116: 1827-1835.
50. Gronthos S, Zannettino AC. (2011) Methods for the purification and characterization of human adipose-derived stem cells. *Methods Mol Biol.*, 702:109-20.
51. Gronthos S, Mankani M, Brahim J et al. (2000) Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:13625–13630.
52. Guttermann DD. (1999) Adventitia-dependent influences on vascular function. *Am J Physiol.*, 277:H1265–H1272.
53. Hanahan D., Weinberg R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70.
54. Hansel DE, Dintzis RZ.(2006) Lippincott's Pocket Pathology. Baltimore, Md: Lippincott Williams & Wilkins:chap 27.
55. Harada S., Rodan G.A.(2003) Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*, 423: 349-355.
56. Haurani MJ, Pagano PJ. (2007) Adventitial fibroblast reactive oxygen species as autocrine and paracrine mediators of remodeling: bellwether for vascular disease? *Cardiovasc Res.*, 7(7):679–689.

57. Herrmann J, Samee S, Chade A, Rodriguez Porcel M, Lerman LO, Lerman A.(2005) Differential effect of experimental hypertension and hypercholesterolemia on adventitial remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* , 25:447– 453.
58. Hisanaga E, Park KY, Yamada S, Hashimoto H, Takeuchi T et al. (2008) [A simple method to induce differentiation of murine bone marrow mesenchymal cells to insulin-producing cells using conophylline and betacellulin-delta4.](#) *Endocr J.*, 55(3):535-43.
59. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M et al. (2005) Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy*, 7(5):393-5.
60. Hoshino A, Chiba H, Nagai K, Ishii G, Ochiai A. (2008) Human vascular adventitial fibroblasts contain mesenchymal stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 368:305–310.
61. Hu Y, Zhang Z, Torsney E, Afzal AR, Davison F, Metzler B, Xu Q. (2004) Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. *J Clin Invest.*,113:1258–1265.
62. Iijima T, Zhang JQ (2002). Three-Dimensional Wall Structure and the Innervation of Dental Pulp Blood Vessels. *Microscopy research and technique*, 56:32–41 Iijima Y., Nagai T., Mizukami M. , Matsuura K, Ogura T et al. (2003) Beating is necessary for transdifferentiation of skeletal muscle-derived cells into cardiomyocytes. *FASEB J*, 17(10):1361-3.
63. Ingram DA, Mead LE, Moore DB, Woodard W, Fenoglio A, Yoder MC. (2005) Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood.* 105:2783–2786.
64. Jenkinson WE, Jenkinson EJ and Anderson G. (2003) *The Journal of Experimental Medicine*, 198(2), 325-332
65. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L. et al. (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418:41-49.
66. Joyce NC, Haire MF, Palade GE. (1985) Contractile proteins in pericytes. Immunoperoxidase localization of tropomyosin. *J Cell Biol*, 100:1379 –1386.
67. Kajiyama H, Hamazaki TS, Tokuhara M, Masui S, Okabayashi K et al. (2010) Pdx1-transfected adipose tissue-derived stem cells differentiate into insulin-producing cells in vivo and reduce hyperglycemia in diabetic mice. *Int J Dev Biol.*, 54(4):699-705.

68. [Karnieli O](#), [Izhar-Prato Y](#), [Bulvik S](#), [Efrat S](#).(2007) Generation of insulin-producing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation. *Stem Cell*, 25(11):2837-44.
69. Klein A.K., Dyck J.A., Stitzel K. et al. (1983) Characterization of canine fetal lymphohematopoiesis: studies of CFU-GM, CFU-L, and CFU-F. *Exp Hematol.*; 11:263-274.
70. Kumar V, Fausto N, Abbas A. (2004) *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*. 7th ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders :chap 27.
71. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S et al. (2001) Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol*, 153:1133–1140.
72. Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K et al.(1997) Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res*,12:1335–13457.
73. LaBarge M.A., Blau H.M. (2002) Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury, *Cell*, 111:589-601.
74. Lamagna C, Bergers G. (2006) The bone marrow constitutes a reservoir of pericyte progenitor. *J Leukoc Biol.*, 80(4):677-81.
75. Lardon J, Rooman I and Bouwens L. (2002) Nestin expression in pancreatic stellate cells and angiogenic endothelial cells. *Histochem Cell Biol*, 117: 535-540
76. Le Blanc K, Ringden O.(2007) Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med.*, 262:509–25.
77. Lendahl U, Zimmerman LB and McKay RD. (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 60: 585-595
78. Li G, Chen SJ, Oparil S, Chen YF, Thompson JA. (2000) Direct in vivo evidence demonstrating neointimal migration of adventitial fibroblasts after balloon injury of rat carotid arteries. *Circulation.*, 101:1362–1365.
79. Li Q, Yu Y, Bischoff J, Muliken JB, Olsen BR.(2003) Differential expression of CD146 in tissues and endothelial cells derived from infantile haemangioma and normal human skin. *J Pathol.*, 201:296–302.

80. Li Y, Zhang R, Qiao H, Zhang H, Wang Y, Yuan H et al. (2007) Generation of insulin-producing cells from PDX-1 gene-modified human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.*, 211(1):36-44.
81. Lindvall O, Kokaia Z.(2006) Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature*, 441:1094 –1096.
82. Logozzi M, De Milito A, Lugini L, Borghi M, Calabrò L et al.(2009) High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One*, 4(4):e5219.
83. Madras N., Gibbs A.L., Zhou Y et al. (2002) Modeling stem cell development by retrospective analysis of gene expression profiles in single progenitor-derived colonies. *Stem Cells*, 20: 230-240.
84. Makino S., Fukuda K., Miyoshi S. et al. (1999) Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest.*, 103(5):697-705.
85. Martinez-Estrada OM, Munoz-Santos Y, Julve J, Reina M, Vilaro S. (2005) Human adipose tissue as a source of Flk-1+ cells: new method of differentiation and expansion. *Cardiovascular Res.* 65:328-333.
86. Martin-Rendon E, Sweeney D, Lu F, Girdlestone J, Navarrete C, Watt SM. (2008) 5-Azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes in vitro at high frequencies. *Vox Sang.*, 95(2):137-48.
87. Mazhari R, Hare JM. (2007) Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: potential influences on the cardiac stem cell niche. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.*, 4:S21–S26.
88. Melotti A, Daga A, Marubbi D, Zunino A, Mutti L, Corte G.(2010) In vitro and in vivo characterization of highly purified human mesothelioma derived cells. *BMC Cancer*, 22(10):54.
89. Mertens F, Fletcher CD, Dal Cin P, De Wever I, Mandahl N. et al. (1998) Cytogenetic analysis of 46 pleomorphic soft tissue sarcomas and correlation with morphologic and clinical features: a report of the CHAMP Study Group. *Chromosomes and Morphology. Genes Chromosomes Cancer* ; 22(1):16-25.

90. Metzle R, Alt C, Bai X, Yan Y, Zhang Z et al.(2011) Human adipose tissue-derived stem cells exhibit proliferation potential and spontaneous rhythmic contraction after fusion with neonatal rat cardiomyocytes. *FASEB J.*,25(3):830-9.
91. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. (2006) Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells.* 24(2):376-385.
92. Mokry J, Cizkova D, Filip S, et al. (2004) Nestin expression by newly formed human blood vessels. *Stem Cells Dev*, 13: 658-664
93. Moriscot C, de Fraipont F, Richard MJ, Marchand M, Savatier P et al. (2005) Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation in vitro. *Stem Cells*, 23(4):594-603.
94. Muraglia A., Cancedda R., Quarto R.(2000) Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci.*, 113:1161–1166.
95. Nehls V. and Drenckhahn D.(1991) Heterogeneity of Microvascular Pericytes for Smooth Muscle Type Alpha-Actin. *The Journal of Cell Biology*, 13(1): 147-154
96. Noort WA, Kruisselbrink AB, in't Anker PS et al. (2002) Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(-) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol*, 30:870–878.
97. Osyczka A.M., Noth U., O'Connor J. et al.(2002) Multilineage differentiation of adult human bone marrow progenitor cells transduced with human papilloma virus type 16 E6/E7 genes. *Calcif. Tissue Int.*, 71: 447-458.
98. Ozerdem U, Grako KA, Dahlin-Huppe K, Monosov E, Stallcup WB. (2002) NG2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis. *Dev Dyn*:218–27
99. Palmer JL, Masui S, Pritchard S, Kalousek DK, Sorensen PH. (1997) Cytogenetic and molecular genetic analysis of a pediatric pleomorphic sarcoma reveals similarities to adult malignant fibrous histiocytoma. *Cancer Genet Cytogenet.*; 95(2):141-7.

100. Paquet-Fifield S, Schlu"ter H, Li A, Aitken T, Gangatirkar P, Blashki D, Koelmeyer R et al.(2009) A role for pericytes as microenvironmental regulators of human skin tissue regeneration. *J Clin Invest.*, 119:2795–2806.
101. Pe'aault B, Rudnicki M, Torrente Y, Cossu G, Tremblay JP, Partridge T, Gussoni E, Kunkel LM, Huard J. (2007) Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance and therapy. *Mol Ther.*, 15: 867–877.
102. Pereira BP, Zhou Y, Gupta A, Leong DT, Aung KZ et al.(2009) Runx2, p53, and pRB status as diagnostic parameters for deregulation of osteoblast growth and differentiation in a new pre-chemotherapeutic osteosarcoma cell line (OS1). *J Cell Physiol.*, 221(3):778-88.
103. Phinney DG., Prockop DJ. (2007) Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair—Current Views. *Stem cells*, [25\(11\)](#): 2896–2902
104. Piepoli MF. (2009) Transplantation of progenitor cells and regeneration of damaged myocardium: more facts or doubts? Insights from experimental and clinical studies. *J Cardiovasc Med.*, 10:624–634.
105. Pittenger MF, MacKay AM, Beck SC et al. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284:143–147.
106. Prusa AR, Marton E, Rosner M, Bernaschek G, Hengstschl"ager M. (2003) Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Hum Reprod.*, 18(7):1489-93.
107. Rajantie I., Ilmonen, M., Alminaitte, A., Ozerdem, U., Alitalo, K., Salven, P. (2004) Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood*, 104:2084–2086.
108. Ribatti D.,Nico B., Crivellato E. (2011) The role of pericytes in angiogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 55: 261-268.
109. Riekstina U, Muceniece R, Cakstina I, Muiznieks I, Ancans J.(2008) Characterization of human skin-derived mesenchymal stem cell proliferation rate in different growth conditions. *Cytotechnology*, 58(3):153-62.
110. Rorive S, Lopez XM, Maris C, Trepant AL, Sauvage S et al.(2010) TIMP-4 and CD63: new prognostic biomarkers in human astrocytomas. *Mod Pathol.*, 23(10):1418-28.

111. Rouget C. (1873) Memoire sur le developpement, la structure et les proprietes physiologiques des capillaries sanguins et lymphatiques. Arch Physiol Normale Path, 5:603-61.
112. Sartore S, Chiavegato A, Faggini E, Franch R, Puato M, Ausoni S, Pauletto P. (2001) Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant. Circ Res., 89:1111–1121.
113. Sarugaser R, Hanoun L, Keating A, Stanford WL, Davies JE. (2009) Human mesenchymal stem cells self-renew and differentiate according to a deterministic hierarchy. PLoS One., 4:e6498.
114. Schugar RC., Chirieleison SM., Wescoe KE., Schmidt BT., Askew Y et al. (2009) High Harvest Yield, High Expansion, and Phenotype Stability of CD146 Mesenchymal Stromal Cells from Whole Primitive Human Umbilical Cord Tissue. J Biomed Biotechnol., 2009:789526
115. Schwab K.E. and Gargett C.E.. (2007) Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. Human Reproduction, 22(11): 2903–2911.
116. Sekiya I, Larson B.L., Smith J.R., Pochampally R., Cui J.G., Prockop D.J.(2002) Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. Stem Cells 2002, 20: 530-541.
117. Shi S, Gronthos S (2003) Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. J Bone Miner Res., 18:696 –704.
118. Shih IM, Wang TL, Westra WH.(1996) Diagnostic and Biological Diagnostic Implications of Mel-CAM Expression in Mesenchymal Neoplasms Clinical Cancer Research, 2:569-575.
119. Shih IM., Elder DE., Hsu MY., and Herlyn, M. (1994) Regulation of Mel-CAM/MUC18 expression on melanocytes of different stages of tumor progression by normal keratinocytes. Am. J. Pathol., 145: 837-845.
120. Shim WS, Jiang S, Wong P., Tan J, Chua YL et al. (2004) Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. Biochem Biophys Res Commun, 324(2):481-488.

121. Sims DE.(2000) Diversity within pericytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, 27:842–846.
122. Siow RC, Mallawaarachchi CM, Weissberg PL. (2003) Migration of adventitial myofibroblasts following vascular balloon injury: insights from in vivo gene transfer to rat carotid arteries. *Cardiovasc Res.*, 59:212–221.
123. Song S., Ewald A. J., Stallcup W., Werb Z., Bergers G. (2005) PDGFR+ perivascular progenitor cells in tumors regulate pericyte differentiation and vascular survival. *Nat. Cell Biol.*, 7:870–879.
124. Song L., Tuan R.S. (2004) Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J.*, 18: 980-982.
125. Sonoda E, Aoki S, Uchihashi K, Soejima H, Kanaji S et al. (2008) A new organotypic culture of adipose tissue fragments maintains viable mature adipocytes for a long term, together with development of immature adipocytes and mesenchymal stem cell-like cells. *Endocrinology*; 149(10):4794-8.
126. Stenmark KR, Davie N, Frid M, Gerasimovskaya E, Das M.(2006) Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling. *Physiology (Bethesda)*. 21:134 –145.
127. Storms RW., Trujillo AP, Springer JB, Shah L, Colvin OM, Ludeman SM, Smith C. (1999) Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *PNAS USA*, 96(16): 9118-9123
128. Terling C, Rass A, Mitsiadis TA, Fried K, Lendahl U and Wroblewski J. (1995) Expression of the intermediate filament nestin during rodent tooth development. *Int J Dev Biol*, 39: 947-956.
129. Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M. et al. (2004) Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential. *Cytotherapy*, 6(4):372-9.
130. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. (2004) Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod.*, 19(6):1450-6.
131. Van den Heuvel R, Versele SR, Schoeters GE, Vanderborght OL. (1987) Stromal stem cells (CFU-f) in yolk sac, liver, spleen and bone marrow of pre- and postnatal mice. *Br J Haematol.*; 66:15-20.

132. Wallace GQ, McNally EM. (2009) Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies. *Annu Rev Physiol.*, 71:37–57.
133. Walsh S, Jefferiss C, Stewart K, Jordan GR et al. (2000) Expression of the developmental markers STRO-1 and alkaline phosphatase in cultures of human marrow stromal cells: regulation by fibroblast growth factor (FGF)-2 and relationship to the expression of FGF receptors 1-4. *Bone*; 27(2):185-95.
134. Wang T, Xu Z, Jiang W, Ma A.(2006) Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate into cardiomyocyte and smooth muscle cell. *Int J Cardiol.*, 109(1):74-81.
135. Warnken M, Reitzenstein U, Sommer A, Fuhrmann M, Mayer P, et al.(2010) Characterization of proliferative effects of insulin, insulin analogues and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in human lung fibroblasts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*; 382(5-6):511-24.
136. Wilcox JN, Scott NA. (1996) Potential role of the adventitia in arteritis and atherosclerosis. *Int J Cardiol.*, 54(suppl):S21–S35.
137. Williams JT, Southerland SS, Souza J et al.(1999) Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg*, 65:22–26.
138. Young HE, Mancini ML, Wright RP et al.(1995) Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *Dev Dyn*, 202:137–144.
139. Zannettino A, Gronthos S.(2009) The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair. *J Cell Physiol.*, 218:237–245.
140. Zhao L.R., Duan W.M., Reyes M. et al. (2002) Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp. Neurol.*, 174: 11-20.
141. Zengin E, Chalajour F, Gehling UM, Ito WD, Treede H, Lauke H, Weil J et al. (2006) Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development*. 133: 1543–1551.
142. Zimmerman K. (1923) Der Peinere Bau der Blutcapillaren. *A Anat Entwicklungsgesch*, 68:29-109

143. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.*, 13(12): 4279-95.
144. Zuk PA, Zhu M, Misino H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benheim P, Lorenz HP, Hedrick MH. (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implication for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7:211-228.