

КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШЕЙ-ДОНОРОВ ПОЙКИЛОТЕРМНЫМ ГИДРОБИОНТАМ КАК МЕТОД КОРРЕКЦИИ ПАТОЛОГИЙ И ПОВЫШЕНИЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

Г.И. ПРОНИНА^{1,2,3}, Н.Ю. КОРЯГИНА², А.А. ИВАНОВ¹,
А.О. РЕВЯКИН³, О.И. СТЕПАНОВА³

(¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева;

² Федеральное Государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства;

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Научный центр биомедицинских технологий» Федеральное медико-биологическое агентство)

Область применения эмбриональных и фетальных СК ограничена из-за их разнонаправленной дифференцировки в организме реципиента с образованием тератом и тератокарцином, а также по этическим соображениям. Поэтому более широко используются стволовые клетки взрослого организма (постнатальные), которые подразделяют на гемопоэтические, мезенхимальные стромальные и тканеспецифичные прогениторные клетки-предшественники. Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) обладают способностью к колониеобразованию и длительному самоподдержанию. Мезенхимальные стромальные стволовые клетки являются предшественниками целого ряда тканей и имеют широкий спектр возможного применения в регенеративной медицине. Тканеспецифичные прогениторные клетки-предшественники замещают погибшие клетки в организме и отвечают за обновление тканей. Гемопоэтические стволовые клетки применяются для трансплантации и специализированной помощи больным с различными первичными и рецидивными онкологическими, гематологическими, иммунологическими и другими заболеваниями. Наиболее эффективной является аутогенная трансплантация, так как риск отторжения трансплантата минимальный. Широкое применение нашла аллотрансплантация СК. Однако при этом требуется специальная подготовка реципиента и совместимость с донором. Ксеногенная трансплантация стволовых клеток является перспективным, но наименее разработанным методом лечения. Это связано с различиями генотипа и того, что встраивания клеток донора в организм реципиента не происходит. Показано, что при ксенотрансплантации стволовых и прогениторных клеток млекопитающих доноров низшим позвоночным и беспозвоночным пойкилотермным гидробионтам с искусственно вызванной патологией происходит регенерация и восстановление поврежденных органов. Введенные в организм половозрелых речных раков и аксолотлей стволовые клетки мышей-доноров стимулируют репродуктивную активность реципиентов. Гидробионты могут явиться потенциальными источниками стволовых клеток. Результаты исследований открывают перспективы использования стволовых клеток в медицинской и ветеринарной практике.

Ключевые слова: *постнатальные стволовые клетки, гемопоэтические стволовые клетки, ксеногенная трансплантация, гидробионты, регенерация, стимуляция репродуктивной активности.*

Характеристика стволовых клеток

Стволовые клетки (СК), обладают таким свойством как потентность – способностью давать начало зрелым (специализированным, дифференцированным) клеточным линиям.

В последние годы используется классификация стволовых клеток по источникам их выделения: эмбриональные, фетальные и постнатальные.

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) обладают потенциями к пролиферации и дифференцируются во все известные типы клеток [10]. Благодаря тотипотентности эти клетки привлекают большое внимание исследователей. Трансплантированные во взрослый организм они в процессе разнонаправленной дифференцировки образуют тератомы и тератокарциномы, состоящие из производных трех зародышевых листков: эктодермы, энтодермы и мезодермы. Возможна воспалительная реакция отторжения трансплантата [30].

Фетальные стволовые клетки (ФСК) являются клетками-предшественницами более высокой степени дифференцировки и не представляют опасности канцерогенеза. Используются эти клетки в клинической практике в ряде азиатских стран, в то время как в России и СНГ исследования ограничиваются из-за отсутствия юридической базы. Изучены три вида ФСК: нейральные стволовые клетки, гематопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники, вырабатывающие инсулин. Использование ФСК в терапевтических целях находится на стадии испытаний и по многим причинам требует определенной осторожности, например, из-за возможности вирусного заражения реципиента. Кроме этических споров и юридических вопросов, использование абортинного материала без специальной проверки чревато серьезными осложнениями (герпес, вирусные гепатиты и даже СПИД). Тем не менее, при правильной подготовке с полным профессиональным контролем, использование фетальных стволовых клеток дает неограниченный потенциал современной медицине [39].

По этим причинам исследователей привлекают **постнатальные стволовые клетки (клетки взрослого организма)**, которые получают чаще всего из костного мозга (КМ), периферической и пуповинной крови, биопсийного материала соответствующих органов. Кроме того, их обнаруживают в жировой ткани, коже, почках, головном мозге. Большинство постнатальных клеток способны давать начало только элементам той ткани, из которой происходят. Количество регионарных СК невелико. Они служат скорее для физиологического обновления ткани, нежели для ее посттравматической регенерации. Этический аспект использования этих клеток не вызывает серьезной полемики и обеспечивает эффективность и безопасность лечения.

Показано, что постнатальные СК обладают свойством хоминга, в результате чего они могут заселять при введении в кровоток идентичные органы взрослого человека. Ядра СК взрослого организма, в частности клеток лимфоидного ряда, обладают свойством, позволяющим этим клеткам сливаться с ядрами соматических дифференцированных клеток и образовывать химерные клетки, обладающие более высокими адаптивными и компенсаторными возможностями [18].

Стволовые клетки взрослого организма делят на три основных группы: гемопоэтические (кроветворные), мультипотентные мезенхимальные (стромальные) и тканеспецифичные прогениторные клетки (клетки-предшественницы). Иногда в отдельную группу выделяют клетки пуповинной крови поскольку они являются наименее дифференцированными из всех клеток зрелого организма, то есть обладают наибольшей потентностью. Пуповинная кровь в основном содержит гемопоэтические стволовые клетки, а также мультипотентные мезенхимальные, но в ней присутствуют и другие уникальные разновидности стволовых клеток, при определенных условиях способные дифференцироваться в клетки различных органов и тканей [35].

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) – мультипотентные стволовые клетки, дающие начало всем клеткам крови.

Определение гемопоэтических клеток было основательно пересмотрено в течение последних 20 лет. Гемопоэтическая ткань содержит клетки с долгосрочными и краткосрочными возможностями к регенерации, включая мультипотентные, олигопотентные и клетки-предшественники. Миелоидная ткань содержит одну ГСК на 10 000 клеток. ГСК являются неоднородной популяцией.

Различают три субпопуляции ГСК, в соответствии с пропорциональным отношением лимфоидного потомства к миелоидному (Л/М). У миелоидно ориентированных ГСК низкое Л/М соотношение ($>0, <3$), у лимфоидно ориентированных – высокое (>10). Третья группа состоит из «сбалансированных» ГСК, для которых $3 \leq \text{Л/М} \leq 10$. В настоящее время активно исследуются свойства различных групп ГСК, однако промежуточные результаты показывают, что только миелоидно ориентированные и «сбалансированные» ГСК способны к продолжительному самовоспроизведению [25].

Эксперименты по трансплантации показали, что каждая группа ГСК преимущественно воссоздаёт свой тип клеток крови, что позволяет предположить наличие наследуемой эпигенетической программы для каждой субпопуляции [21].

Источниками получения ГСК могут являться костный мозг и пуповинная кровь. В костном мозге взрослого организма ГСК располагаются в бедренных костях, рёбрах, грудины и других костях. Клетки могут быть получены непосредственно из бедра при помощи иглы и шприца, или из крови после предварительной обработки цитокинами, включая G-CSF (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор), способствующий высвобождению клеток из костного мозга.

Направление дифференцировки ГСК определяется кроветворным микроокружением. Влияние кроветворного микроокружения на гемопоэз реализуется: 1) путем прямых межклеточных контактов между ГСК и клетками стромы; 2) при взаимодействии ростовых факторов с молекулами экстрацеллюлярного матрикса и мембранными протеинами; 3) продукцией компонентами кроветворного микроокружения гемопоэтических ростовых факторов, которые играют важную роль в регуляции деятельности и направления дифференцировки клеток-предшественниц.

Большое значение в нормальном функционировании системы гемопоэза имеют гемопоэтические ростовые факторы, к которым относятся собственно ростовые факторы и интерлейкины (ИЛ). Ростовые факторы называются также колониестимулирующими факторами (КСФ), поскольку они обладают способностью стимулировать клетки-предшественницы различных линий к образованию колоний созревающих клеток *in vitro*. В настоящее время описано около 20 гемопоэтических ростовых факторов [14].

Пуповинная кровь как источник гемопоэтических стволовых клеток обладает рядом преимуществ, среди которых быстрая и безболезненная процедура сбора; возможность получения и длительного хранения аутологичных, родственных и неродственных аллогенных образцов, тестированных и HLA-типированных (HLA (Human Leucocyte Antigen) – большой комплекс тканевой совместимости человека), непосредственно готовых к использованию; сниженная вероятность развития острой и хронической формы реакции «трансплантат против хозяина»; возможность проведения трансплантаций с неполной HLA-совместимостью; сниженная вероятность вирусной контаминации трансплантата; возможность получения образцов от представителей редких этнических меньшинств и детей от смешанных браков [26].

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) – мультипотентные стволовые клетки, способны дифференцироваться в остеобласты (клетки костной ткани), хондроциты (хрящевые клетки) и адипоциты (жировые клетки), кардиомиоциты, нейроны, гепатоциты.

Предшественниками ММСК в эмбриогенный период развития являются мезенхимальные стволовые клетки (МСК). Они могут быть обнаружены в местах распространения мезенхимы, то есть зародышевой соединительной ткани. Показана эффективность применения МСК для реэпителизации, репарации и регенерации [27]. Рядом исследований показано, что МСК не отторгаются при алло- и ксенотрансплантации [23].

Основным источником ММСК является костный мозг. Они обнаруживаются в жировой ткани и ряде других тканей с хорошим кровоснабжением, периваскулярно, в пульпе молочных зубов, амниотической (околоплодной) жидкости, пуповинной крови и вартеновском студне. ММСК человека могут избегать отторжения при трансплантации, вступать во взаимодействие с дендритными клетками и Т-лимфоцитами и создавать иммуносупрессивную микросреду посредством выработки цитокинов [42].

Тканеспецифичные прогениторные клетки (клетки-предшественницы) – малодифференцированные клетки, которые располагаются в различных тканях и органах и отвечают за обновление их клеточной популяции, то есть замещают погибшие клетки. К ним, например, относятся миосателлитциты (предшественники мышечных волокон), клетки-предшественницы лимфо- и миелопоэза. Эти клетки являются олиго- и унипотентными и их главное отличие от других стволовых клеток в том, что клетки-предшественницы могут делиться лишь определенное количество раз, в то время как другие стволовые клетки способны к неограниченному самообновлению. Поэтому их принадлежность к истинно стволовым клеткам подвергается сомнению.

Отдельно исследуются нейральные стволовые клетки, которые также относятся к группе тканеспецифичных. Они дифференцируются в процессе развития эмбриона и в плодный период, в результате чего происходит формирование всех нервных структур будущего взрослого организма, включая центральную и периферическую нервную системы. Несмотря на то, что большая часть погибших нейронов не замещается, процесс нейрогенеза во взрослой ЦНС возможен за счёт нейральных стволовых клеток, то есть популяция нейронов может «восстанавливаться», однако это происходит в таком объёме, что не сказывается существенно на исходах патологических процессов.

В настоящее время путем перепрограммирования «взрослых» клеток путем введения в них «эмбриональных» генов получены индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (induced pluripotent stem cells, iPSC или iPS) [37].

Получение стволовых клеток

Существует несколько источников и методов получения стволовых клеток.

Эмбриональные стволовые клетки выделяют из эмбрионов, полученных из яйцеклеток, оплодотворенных *in vitro* (в клиниках, занимающихся экстракорпоральным оплодотворением). Внутреннюю клеточную массу бластоцистов 4–5 дневных эмбрионов переносят в богатую питательными веществами культуральную среду, где клетки начинают активно делиться. После 6 и более месяцев после многократных циклов пересева (пассажей) получают линию эмбриональных стволовых клеток (рис. 1), остающихся плюрипотентными и сохранившие нормальный набор генов [41].

Фетальные стволовые клетки получают от плода из абортивного материала после прерывания беременности (у человека в сроке от 5 до 12 недель) или после выкидыша; эти клетки являются соматическими (тканеспецифическими), прошедшими первичную дифференцировку. Процедура выделения фетальных стволовых клеток довольно сложная, требует специальных знаний и особенного оборудования [5].

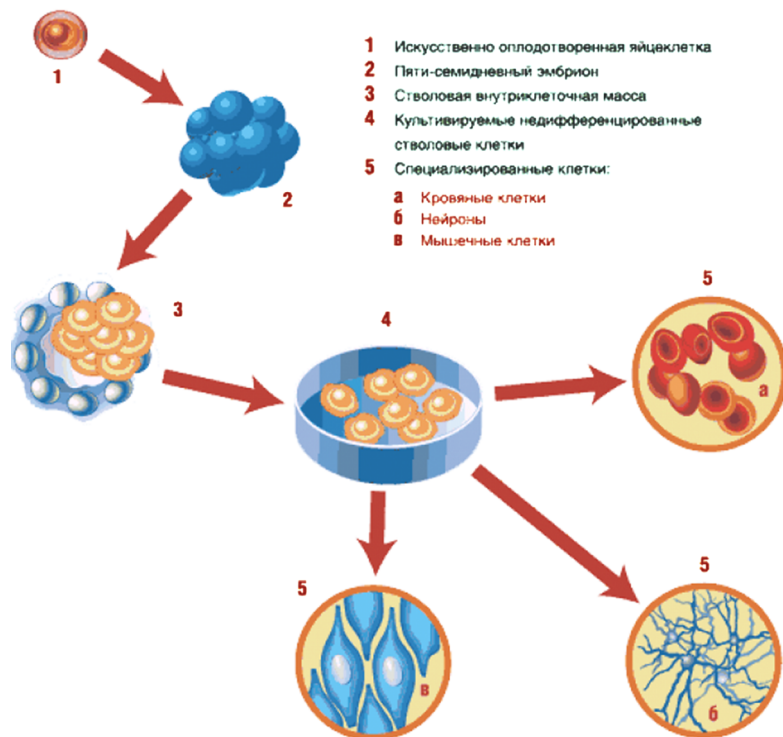


Рис. 1. Выращивание стволовых клеток

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) получают из костного мозга и периферической крови.

Для сбора костного мозга под общей анестезией в условиях операционной делаются проколы тазовых костей специальными иглами с широким просветом. При этом забирают около литра жидкого костного мозга. Это составляет не более 5% от общего объема костного мозга донора, что полностью компенсируется в течение двух недель. Донор костного мозга подбирается по признаку иммунологической совместимости (по белкам, входящим в состав HLA-комплекса) с больным. Совпадение группы крови и резус-фактора у донора и пациента не обязательно.

Получение ГСК из периферической крови осуществляется методом цитафереза: изъятие малыми порциями (50–200 мл) крови из вены с фильтрацией ГСК и последующим возвращением всей оставшейся крови донору. При этом донор проходит пятидневный подготовительный период, в течение которого подкожно вводится препарат, стимулирующий выход стволовых гемопоэтических клеток в кровь [12].

Не существует единого протокола культивирования постнатальных стволовых клеток *in vitro*, практически каждая лаборатория предлагает свои вариации состава ростовой среды, антибиотиков, субстратов.

Мы в своих исследованиях используем следующий метод получения смешанной культуры ГСК и ММСК на живых (под эфирным наркозом) и трупных мышцах-донорах (срок гибели животных 30–40 минут). Жизнеспособность клеток гемопоэтической и стромальной фракций клеток костного мозга (ККМ) определяется по окраске трипановым синим. После стерильного иссечения кости обрабатываются в 70% спирте и вымываются раствором Хенкса (без Ca^{+2} и Mg^{+2}) из костномозгового канала ККМ.

Полученная смешанная суспензия клеток центрифугируется вместе с лизирующим раствором. Затем надосадочная фаза удаляется путем отсасывания. Отмытая

от эритроцитов и полученная смесь клеток ресуспендируется в питательной ростовой среде DMEM. Клетки культивируются в CO₂-инкубаторе в течение 3-х суток. Полученная смешанная культура (рис. 2) из гемопоэтических и стромальных клеток костного мозга от мышей-доноров готова для трансплантации [3].

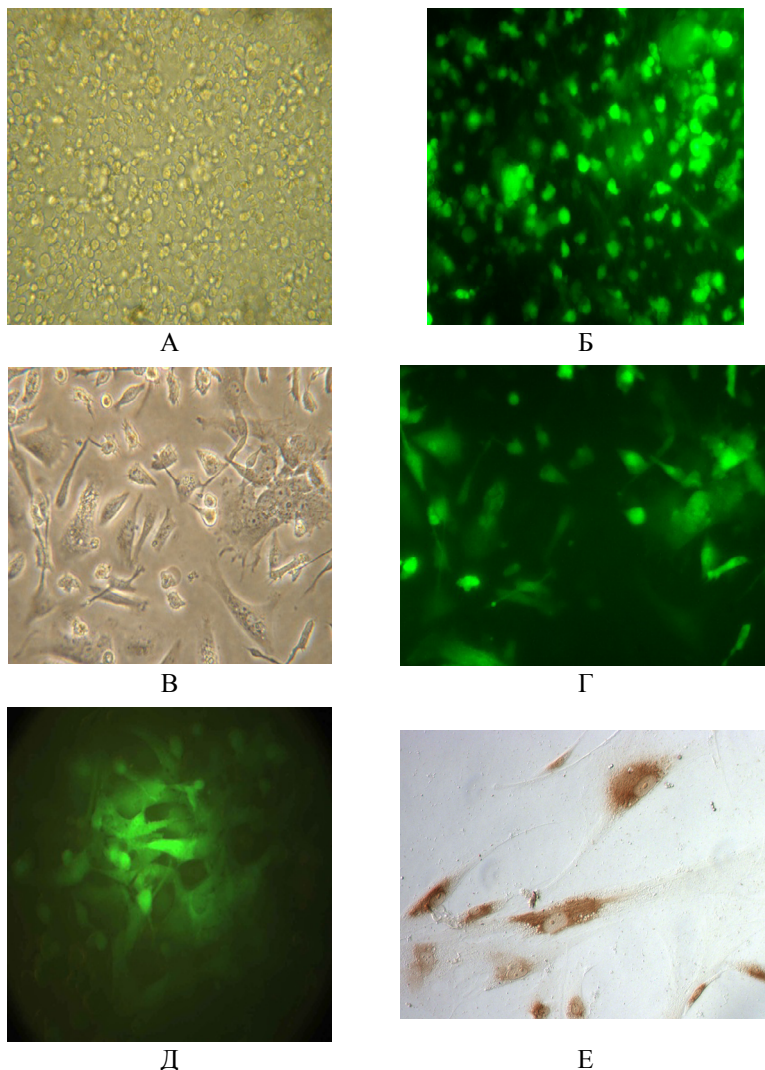


Рис. 2. Получение стволовых клеток. Микроскопия.

А и Б. 4-х суточная культура неприкрепившихся гемопоэтических клеток (мононуклеарная фракция) от доноров мышей с геном зеленого протеина (GFP) Увел. 200:

А – фазовый контраст; Б – люминесцентная микроскопия

Культура мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга у мышей-доноров и на разных сроках культивирования. Увел. 200.

Б и В – 4-х суточная культура ММСК КМ (фибробластоподобные клетки) от доноров мышей с GFP:

А – фазовый контраст; Б – люминесцентная микроскопия;

В – 12 суточная культура ММСК КМ (фибробластоподобные клетки) от доноров мышей B10.GFP Увел. X600; люминесцентная микроскопия.

Е – Идентификация мезенхимальных стволовых клеток мыши в культуре маркером на collagen I типа. Увел. 600.

Особым образом (во время операций на субвентрикулярной области боковых желудочков и зубчатой извилине гиппокампа) выделяют нейральные стволовые клетки человека, которые в культуре образуют нейросферы (нейральные шары), а после диспергирования и преформирования последних – все главные клеточные типы ЦНС или, в специальной среде, новые микросферы [29]. В суспензионных культурах диссоциированной ткани, выделенной из перивентрикулярных отделов эмбрионального мозга, также возникают нейросферы [20].

Технологии изоляции СК из жировой ткани с применением ферментирования за последние десятилетия практически не изменились. При классической липосакции сущность базисной методики выделения СК из жировой ткани заключается в разделении биологического субстрата, аспирированного из организма донора, на три слоя. Верхний слой – маслянистый, содержит гомогенат из зрелых адипоцитов, разрушаемых в ходе операции; средний – слой интактной жировой ткани и нижний, содержащий компоненты раствора, инфильтрируемого в ткани пациента перед хирургическим вмешательством, а также плазму и форменные элементы крови. Затем удаляют верхний и нижний слои. Оставшийся жировой слой промывается стерильным раствором фосфатного буфера с добавлением антибактериальных и противомикотических средств для снижения вероятности микробной контаминации биологического материала и исключения возможности тканевых (неклеточных) загрязнений сформированного биологического материала. После промывания жировой ткани слой ферментируется стерильным раствором коллагеназы, с целью освобождения компонентов стромальной сосудистой фракции, содержащей стволовые клетки [11].

Применение и перспективы использования стволовых клеток

Использование эмбриональных стволовых клеток рассматривается в качестве потенциального метода терапии многих заболеваний [10]. Однако применение ЭСК ограничено из-за того, что процессы их деления и развития после трансплантации в организм реципиента невозможно контролировать.

Поэтому более широко применяют постнатальные СК. В частности, ММСК, и продуцируемые ими белки участвуют в создании остова различных органов, который, интегрируясь с паренхиматозными клетками, обеспечивает их оптимальное функционирование. Поэтому их применение изучается при патологиях органов [9].

Трансплантация стволовых клеток нашла широкое применение в лечении многих гематологических, онкологических, генетических и других заболеваний.

Различают следующие виды трансплантации:

– *Аутогенная* – вид трансплантации, которая проводится в пределах одного организма.

– *Аллогенная (гомогенная)*; вид трансплантации, который проводится в пределах одного биологического вида (от человека человеку, в эксперименте, между животными одного вида).

– *Ксеногенная (гетерогенная)* – вид трансплантации донор и реципиент относятся к разным биологическим видам.

Аутогенная трансплантация стволовых клеток является наиболее эффективным методом лечения, так как при ней не происходит отторжения трансплантата. Например, после трансплантации аутологичных кроветворных СК происходила длительная ремиссия инсулинзависимого сахарного диабета после высокодозной химиотерапии [32]. Следует отметить, что именно проведение трансплантации в ранние сроки заболевания, при условии сохранения достаточного числа инсулин-продуцирующих клеток, сделало возможным восстановление инсулиннезависимого статуса у этих больных.

Однако этот метод не всегда применим, из-за наличия заболеваний у донора, который является реципиентом.

Поэтому чаще всего в медицинской практике используется *аллогенная* трансплантация стволовых клеток.

С 60-х годов после опытов на мышах по настоящее время используется аллогенный костный мозг для лечения лейкозов, апластической анемии, радиационных поражений, проведения химиотерапии [34]. При пересадке аллогенного костного мозга приживление трансплантата возможно при совпадении донора и реципиента по антигенам главного комплекса гистосовместимости (ГКГС). Если это совпадение отсутствует, развивается реакция “трансплантат против хозяина” (РТПХ), которая часто приводит к смерти больного [1].

Группой Banerjee, et al. [19] было показано, что нефракционированный костный мозг, полученный из бедренной кости здоровых мышей, способен корректировать уровень сахара в крови у мышей-реципиентов (швейцарские мыши-альбиносы) с сахарным диабетом I типа, вызванным стрептозотоцином (STZ). В других исследованиях [22] была также четко показана возможность коррекции СД 1 типа с помощью стволовых и прогениторных клеток костного мозга (ККМ). В этих исследованиях в качестве доноров были использованы здоровые мыши – GFP с геном зеленого белка. Аналогичные результаты были получены при 2-х кратном введении ММСК ККМ мышам с моделью STZ сахарного диабета 1 типа, которые доказали способность стволовых прогениторных ККМ (фибробластоподобных) к трансдифференцировке в β -клетки [32]. Группа авторов [28] предположила, что ККМ могут играть важную роль в синтезе эндогенного HGF в организме. В частности путем прямого или паракринного взаимодействия с гепатоцитами с помощью пока неизвестных факторов повышать секрецию HGF. Последний способен стимулировать дифференцировку $c\text{-met}^+$ -эпителиальных клеток протоков поджелудочной железы в инсулин продуцирующие клетки. Известно, что взаимодействие между рецепторами $c\text{-met}^+$ и HGF, которое происходит в организме опосредованно путем обмена сигналами между мезенхимальными [38] и эпителиальными клетками, играет важную роль на эмбриональном этапе развития ПЖ [28].

Между тем, для лечения сахарного диабета наиболее интенсивно применялись клетки не стромальной фракции ММСК, а клетки гемопоэтической (моноклеарной) фракции. Это связано с тем что, моноклеарная фракция ККМ содержит значительное количество стволовых и прогениторных клеток, в том числе клеток лимфоидного ряда различной степени зрелости. Эти клетки способны не только мигрировать и пролиферировать, но и индуцировать физиологическую и репаративную регенерацию паренхиматозных органов и клеток, выделяя в процессе жизнедеятельности регуляторные пептиды и факторы, обладающие морфогенетическими свойствами [31]. Регуляторные пептиды органов, в особенности органов иммунной системы, осуществляют передачу информационных сигналов с надклеточного уровня внутрь клетки и от клетки к клетке, выполняя роль мессенджеров межклеточных взаимодействий [15].

Показана возможность применения *стволовых клеток пуповинной крови* для лечения воспалительно-деструктивных процессов десны. Донорами и реципиентами являлись крысы. У всех животных в конце эксперимента наблюдались процессы полной регенерации клеточно-волокнистого компонента, подтвержденные его качественным составом при соотношении коллагеновых и презластических волокон 3:1, что соответствует гистологической норме и демонстрирует факт наличия высокого дифференцировочного потенциала полученных стволовых клеток [16].

Применение стволовых клеток в медицине, а тем более в ветеринарии ограничено по экономическим причинам, а именно из-за малой доступности источников

стволовых клеток, и по гуманным соображениям. Поэтому начаты исследования по **ксенотрансплантации** стволовых клеток.

По проблеме межвидовой трансплантации стволовых гемопоэтических клеток исследований очень мало и в основном они выполнены в пределах класса млекопитающих [2]. Имеются работы по ксенотрансплантации для снижения уровня гликемии и нормализации функции почек у трансгенных мышей [3].

Разновидностью ксенотрансплантации является метод, так называемой, терапии «свежими» стволовыми клетками. Этот метод заключается в использовании клеток животных, извлекаемых из эмбриона или плода овцы, которые вводят в организм пациента с целью достижения эффекта ревитализации [40]. Разумеется, клетки животных не способны встроиться в организм пациента, однако, они снабжают его гуморальными факторами, способствующими оздоровлению и активируют его иммунную систему.

Установлено, что нервные стволовые клетки характеризуются выраженным консерватизмом, так что человеческие стволовые клетки способны мигрировать и развиваться в случае их трансплантации в мозг крысы. Более того, в экспериментах было показано, что даже нервные стволовые клетки дрозофилы способны дифференцироваться в случае их ксенотрансплантации в мозг такого отдаленного таксона, как крыса. Для этой цели были получены трансгенные линии дрозофилы, содержащие человеческие гены, кодирующие нейротрофические факторы NGF, GDNF, BDNF. Человеческие гены были встроены в вектор Casper под дрозофилиным хит-шоковым промотором, так что температура тела млекопитающих служила автоматическим активатором соответствующих генов. Для идентификации клеток дрозофилы в геном трансгенных линий был введен ген бактериальной галактозидазы lacZ, продукт которого легко выявляется с помощью гистохимической Х-гал окраски. Тем самым нервные клетки ксенотрансплантата легко обнаруживаются среди клеток реципиента или котрансплантата. Оказалось, что нервные стволовые клетки дрозофилы не только выживают, но и мигрируют и дифференцируются в мозге крысы [13].

После ксенотрансплантации нейральных стволовых клеток человека в мозг половозрелых крыс отмечается их активная миграция [14]. Известно, что процесс миграции и дифференцировки нейральных стволовых клеток контролируется набором специальных генов [4]. Иницирующий миграционный сигнал клетке-предшественнику к началу дифференцировки дает белковый продукт протоонкогена c-ret совместно с фактором GDNF. Следующий сигнал поступает от гена mash-1, который управляет выбором пути развития клетки. Кроме того, специфическая реакция дифференцирующихся клеток зависит также от а-рецептора цилиарного нейротрофического фактора [24].

В модельных экспериментах на гидробионтах нами использовались стволовые клетки мышей-доноров. Выявлено, что парентеральное введение (речным ракам в вентральный синус, рыбам внутривенно, аксолотлям внутривентрально) стволовых и прогениторных клеток млекопитающих доноров (мышей) в дозе 10 млн клеток костного мозга инициирует регенерацию тканей и восстановление пораженных паренхиматозных органов (рис. 3–4) [6]. Введение стволовых клеток ускоряет процесс регенерации ампутированных конечностей аксолотлей (рис. 5) [7]. Показано, что ксенотрансплантация стволовых клеток мышей-доноров активирует репродуктивную функцию половозрелых реципиентов (речных раков и аксолотлей), а именно сперматогенез, оплодотворение и откладку икры (рис. 6–7) [8]. Во всех случаях полимеразная цепная реакция не показала наличия у реципиентов-гидробионтов встроенного гена зеленого протеина от мышей-доноров. Это свидетельствует о том, что при ксенотрансплантации стволовые клетки мышей-доноров не развиваются в организме речных раков, рыб, аксолотлей [36], что закономерно, так как доноры и реципиенты относятся к систематически отдаленным видам с разным генотипом.

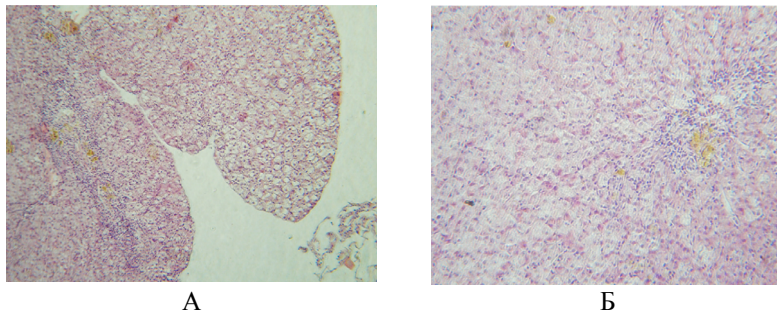


Рис. 3. Регенерация печени рыб после введения ККМ.

Окраска гематоксилином-эозином. Ув. $\times 200$

А – Печень карпа с искусственно вызванной жировой дистрофией.
Б – Регенерация печени карпа через 2 недели после введения ККМ.

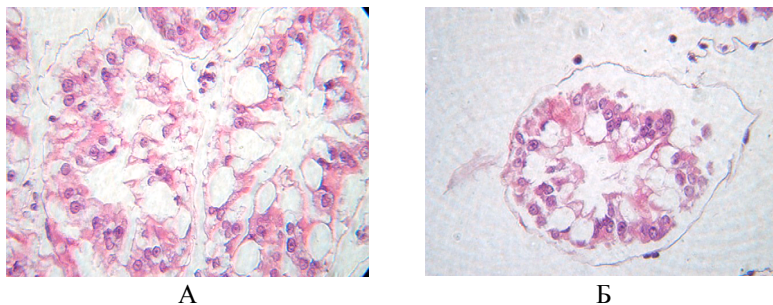


Рис. 4. Регенерация гепатопанкреаса речных раков после введения ККМ.

Окраска гематоксилином-эозином. Ув. 400

А – Гепатопанкреас речного рака *Pontastacus leptodactylus*. Вакуолизация R-клеток.
Б – Восстановление структуры гепатопанкреаса через 2 недели после введения стволовых клеток

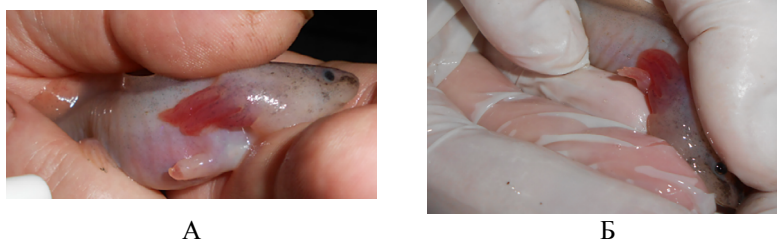


Рис. 5. Регенерация конечностей аксолотлей через 6 недель после ампутации:

А – контроль; Б – опыт с введением ККМ



Рис. 6. Самка речного рака *Pontastacus leptodactylus* с икрой и прикрепленными сперматофорами после введения стволовых клеток мышей-доноров

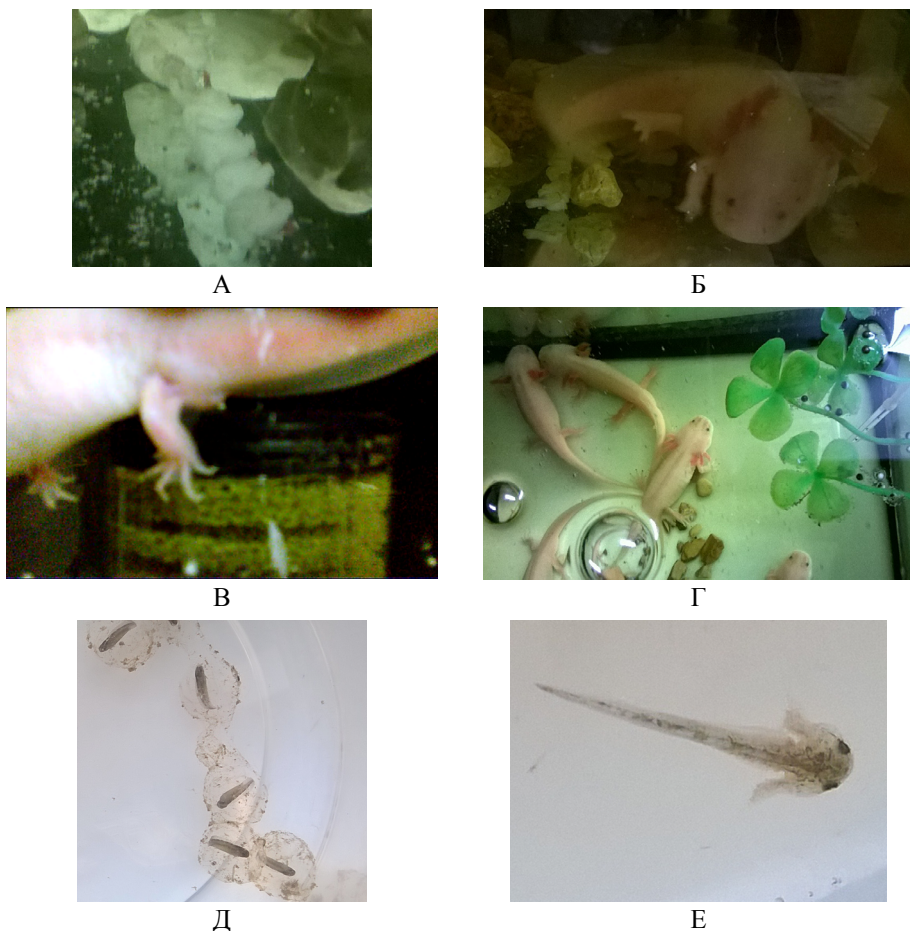


Рис. 7. Стимулированная репродуктивная активность аксолотлей введением ККМ мышей-доноров.
 А – Сперматофоры самцов аксолотлей на дне аквариума;
 Б – Захват сперматофоров самками аксолотлей; В – Откладка оплодотворенной икры самками;
 Г – Сверху искусственные растения с отложенной на них икрой, внизу аквариума – аксолотли;
 Д – Икра; Е – Личинка

В настоящее время генерированы органоиды из плюрипотентных стволовых клеток *in vitro* с использованием двухмерных и 3D культур, которые повторяют свойства различных конкретных субрегионов множества человеческих органов [17].

Из стволовых клеток выделяют опухолевые маркеры. Например, маркерами незрелых клеток головного мозга служат нестин, р-тубулин III (маркер нейрональной линии), виментин, GFAP и NCAM, для иммуноцитохимической идентификации которых используются моноклональные антитела. Нестин (белок промежуточных нейрофиламентов IV типа) экспрессируют в мультипотентные нейроэктодермальные клетки. Этот белок применяют для идентификации и выделения из ЦНС мультипотентных нейроэпителиальных клеток-предшественников с помощью моноклональных антител Rat-401, которые позволяют обнаружить до 95% клеток нервной трубки эмбрионов крысы на одиннадцатый день гестации. Нестин не экспрессируется на дифференцированных потомках нейральных стволовых клеток [33], однако присутствует в ранних нейральных клетках-предшественниках, постмитотических нейронах и ранних. С помощью этого маркера идентифицированы нейроэпителиальные клетки-предшественники и доказано существование стволовых клеток в ЦНС.

Заключение

Таким образом, трансплантированные СК встраиваются в организм реципиента и выполняют функцию регенерации и репарации пораженных органов и тканей. При аутогенной трансплантации СК не происходит отторжения трансплантата, так как донор является реципиентом. Широко применяется также аллогенная трансплантация СК, в основном постнатальных. При этом возможен риск отторжения трансплантата.

Трансплантация стволовых клеток может оказывать и отрицательное действие. Особенно это относится к наименее дифференцированным эмбриональным стволовым клеткам, вызывающим развитие у реципиента злокачественных новообразований. Ксенотрансплантация при современном уровне развития трансплантологии остается невозможной. Восстановление поврежденных структур паренхиматозных органов рыб и речных раков, которым вводились стволовые клетки мышей-доноров, вероятно, происходит за счет выделяемых этими клетками биологически активных веществ, которые запускают каскад ферментов, стимулирующих репаративную регенерацию. Отсутствие гена зеленого белка в опытных образцах свидетельствует о том, что замещение дефекта гепатопанкреаса гидробионтов происходит не за счет встраивания и дифференциации стволовых клеток мышей, что закономерно: присутствуют слишком значительные различия в геноме, так как доноры и реципиенты занимают разное, далекое друг от друга систематическое положение.

Ускорение регенерации утраченной конечности аксолотлей после введения стволовых клеток мышей, по-видимому, связано с тем, что стволовые клетки мышей оказывают опосредованное действие на организм гидробионтов путем секреции цитокинов, которые активизируют рост собственных гемопоэтических предшественников. Соответственно усиливается пролиферация бластных форм клеток, их созревание, миграция в зону дефекта и замещение ткани.

Стимуляция репродуктивной активности речных раков, вероятно, также связана с действием секретируемых стволовыми клетками биологически активных веществ.

Введенные в организм гидробионтов стволовые клетки мышей-доноров вызывают восстановление патологически измененных паренхиматозных органов рыб и речных раков (печени, гепатопанкреаса), ускоряют регенерацию утраченных конечностей аксолотлей, стимулируют репродуктивную активность речных раков. Полученные данные позволяют расширить возможности использования стволовых клеток на гидробионтах с целью ускорения регенерации патологически измененных органов и тканей, стимуляции репродуктивной активности. Результаты исследований создают предпосылки для использования пойкилотермных гидробионтов в качестве альтернативного источника СК.

Библиографический список

1. Грицаев С.В., Павлова И.Е., Семенова Н.Ю. Отдельные аспекты трансплантации гемопоэтических стволовых клеток онкогематологическим больным // Вестник гематологии, 2015. т. 11, № 3. С. 9–21.
2. Иванов А.А. Использование органов животных для трансплантации человеку (ксенотрансплантология). В кн.: Этология с основами зоопсихологии // СПб.: Лань, 2013. С. 608–617.
3. Касинская Н.В., Степанова О.И., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Семенов Х.Х., Бескова Т.Б., Капанадзе Г.Д., Ревякин А.О., Деньгина С.Е. Ген зеленого

белка как маркер при трансплантации стволовых и прогениторных клеток костного мозга // М.: Биомедицина, 2011. № 2. С. 30–34.

4. Корочкин Л.И., Ревякин Ф.В., Охотин В.Е. Нейральные стволовые клетки и их значение в восстановительных процессах в нервной системе // Морфология. Обзорные и общетеоретические статьи. 2005. С. 7–16.

5. Криворучко Н.А. Основные свойства и перспективы применения фетальных стволовых клеток // Клиническая медицина Казахстана, 2012. № 2(25). С. 133–136.

6. Пронина Г.И., Корягина Н.Ю., Ревякин А.О., Капанадзе Г.Д., Степанова О.И., Баранова О.В., Касинская Н.В. Трансплантация клеток костного мозга мышей рыбам и речным ракам // Международный научно-исследовательский журнал: Сборник по результатам VII заочной научной конференции Research Journal of International Studies. Екатеринбург: МНИЖ, 2014. № 1(20) Часть 1. С. 17–18.

7. Пронина Г.И., Корягина Н.Ю., Ревякин А.О., Степанова О.И., Курищенко Ж.О., Петрова Н.В. Использование гидробионтов в качестве альтернативных биомоделей // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. СПб. 2017. Russian journal of physiology (formerly I.M. Sechenov Physiological Journal). 103 N8. С. 912–929.

8. Пронина Г.И., Ревякин А.О., Корягина Н.Ю., Капанадзе Г.Д., Степанова О.И., Курищенко Ж.О. Влияние стволовых клеток на репродуктивную функцию речных раков // Биомедицина, 2015. № 1. С. 81–84.

9. Расулов М.Ф. Использование мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и эмбриональных фибробластов в лечении ожоговых ран // Тихоокеанский мед. журнал, 2004. № 1(15). С 7–9.

10. Репин В.С., Сабурова И.Н. Эмбриональные и взрослые стволовые клетки: место в современной медицине // Лаб. медицина. 2006. № 8. С 33–41.

11. Романенков Н.С., Мовчан К.Н. Результаты применения мезенхимальных стволовых клеток из аутологичной жировой ткани в пластической и реконструктивной хирургии (обзор литературы) // Вестник СПбГУ: Медицина, 2016. Сер. 11, Вып. 4. С. 85–95.

12. Степанова О.И., Касинская Н.В., Баранова О.В., Семенов Х.Х., Ревякин А.О. Метод культивации и фенотипическая характеристика гемопоэтических клеток костного мозга (моноклеарной фракции) от доноров с геном зеленого белка // М.: Биомедицина, 2013. № 3. С. 91–94.

13. Сухинич К.К., Подгорный О.В., Александрова М.А. Иммуногистохимический анализ развития суспензионных и тканевых нейротрансплантатов // Известия РАН. Серия биологическая. М.: Наука. 2011. № 6. С. 659–669.

14. Сухих Г.Г., Малайцева В.В., Богданова И.М. Перспектива использования фетальных/прогенитивных клеток человека клеточной терапии // Клеточные технологии в биологии и медицине. Изд-во РАМН, 2008. № 1. С. 5–14.

15. Хавинсон В.Х., Кветной И.М., Южаков В.В., Попучиев В.В., Коновалов С.С. Пептидергическая регуляция гомеостаза. СПб: Наука, 2003. 190 с.

16. Ярыгин Е.И., Алямовский В.В., Шестакова Л.А. Технология получения концентрата стволовых клеток пуповинной крови для использования в стоматологии: метод, рекомендации для интернов, ординаторов по специальности «Стоматология общей практики». Красноярск: КрасГМУ, 2014. 28 с.

17. Ader M., & Tanaka E.M. Modeling human development in 3D culture // Current Opinion in Cell Biology, 2014. Vol. 31. P. 23–28.

18. Alvarez-Dolado M., Pardo R., Garcia-Verdugo J.M., Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes // Nature, 2003. Vol. 425. P. 968–972.

19. *Banerjee M., Kumar A., Bhonde R.R.* Reversal of experimental diabetes by multiple bone marrow transplantation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005. Vol. 328(1). P. 318–325.
20. *Bjorklund A., Lindvall O.* Cell replacement therapies for central nervous system disorders // *Nature Neuroscience*, 2000. Vol. 3. P. 537–44.
21. *Bonnet D.* Hematopoietic stem cell niche, Vol. 1 // *Advances in stem cells and their niches*. English: Academic Press. 2017. 186 p.
22. *Chen L.B., Jiang X.B., Yang L.* Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells // *World J. Gastroenterol*, 2004. Vol. 10(20). P. 3016–3020.
23. *Chiu C.H., Su L.H., Chu C., Chia J.H., Wu T.L., Lin T.Y., Lee YS, Ou J.T.*, Isolation of *Salmonella enterica* serotype choleraesuis resistant to ceftriaxone and ciprofloxacin // *Lancet*. 2004. Vol. 363(9417). P. 1285–1286.
24. *Gershon A.A., Steinberg S., Gelb L.* Live attenuated varicella vaccine: protection in healthy adults in comparison to leukemic children. // *J. Infect. Dis.*1990, Vol. 161. P. 661–666.
25. *Greenbaum A., Hsu Y.M, Day R.B, Schuettpelz L.G, Christopher M.J, Borgerding J.N, Nagasawa T, Link D.C.* CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance // *Nature*, 2013. Vol. 495(7440). P. 227–30. doi: 10.1038/nature11926.
26. *Haller MJ., Wasserfall CH, McGrail KM, Cintron M, Brusko TM, Wingard JR, Kelly SS, Shuster J.J, Atkinson MA, Schatz DA.* Autologous umbilical cord blood transfusion in very young children with type 1 diabetes // *Diabetes Care*, 2009. Vol. 32(11):2041–2046. doi: 10.2337/dc09–0967.
27. *Horwitz E.M., Gordon P.L., Koo W.K., Marx J.C., Neel M.D., McNall R.Y., Muul L. and Hofmann T.* Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002. Vol. 99. P. 8932–8937. doi: 10.4236/oalib.1101505
28. *Izumida Y., Aoki T., Yasuda D. et al.* Hepatocyte growth factor is constitutively produced by donor-derived bone marrow cells and promotes regeneration of pancreatic beta-cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005. Vol. 333(1). P. 273–282.
29. *Johansen R., Needham J.R., Colquhoun. D.J., Poppe T.T., Smith A.J.* Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research. // *Laboratory Animals*, 2006. Vol. 40. P. 323–340.
30. *Keirstead H.S., Nistor G., Bernal G., Totoiu M., Cloutier F., Sharp K., Steward O.* Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cell Transplants Remyelinate and Restore Locomotion after Spinal Cord Injury // *Journal of Neuroscience*, 2005, Vol. 25(19) 4694–4705; doi: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0311–05.2005>
31. *Kinnaird T., Stabile E., Burnett M.S, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE.* Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms // *Circ. Res.*, 2004. Vol. 94(5). P. 687–692.
32. *Lee R.H., Seo M.J., Reger R.L. Spees JL, Pulin AA, Olson SD, Prockop D.J.* Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice/USA // *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2006. Vol. 103(46). P. 17438–17443.
33. *Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD.* CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 1990 Vol. 60(4). P. 585–95.
34. *Ohga S., Kudo K., Ishii E. Honjo S, Morimoto A, Osugi Y, Sawada A, Inoue M, Tabuchi K, Suzuki N, Ishida Y, Imashuku S, Kato S, Hara T.* Hematopoietic stem cell

transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. // *Pediatr Blood Cancer*, 2010. Vol. 54. P. 299–306.

35. *Pettinger M.F., Martin B.J.* Mesenchimal stem cells and their potential as cardiac therapeutics // *Circ. Res*, 2004. Vol. 95. P. 9–20.

36. *Pronina G.I., Koryagina N.Yu., Revyakin A.O., Stepanova O.I., Kurischenko J.O., Petrova N.V.* Recovery of the organism of poikilothermic hydrobionts using mammalian stem cells // *Human & Veterinary Medicine Open Access International Journal of the Bioflux Society*, 2018. Vol. 10. Issue 1. P. 10–15.

37. *Rais Y., Zviran A., Geula S., Gafni O., Chomsky E., Viukov S., Mansour A.A.F., Caspi I., Krupalnik V., Zerbib M., Maza I., Mor N., Baran D., Weinberger L., Jaitin D.A., Lara-Astiaso D., Blecher-Gonen R., Shipony Z., Mukamel Z., Hagai T., Gilad S., Amann-Zalcenstein D., Tanay A., Amit I., Novershtern N., Hanna J.H.* Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency // *Nature*, 2013. Vol. 502(7469). P. 65–70. doi: 10.1038/nature12587

38. *Sonnenberg E., Meyer D., Weidner K.M., Birchmeier C.* Scatter factor hepatocyte growth factor and its receptor, the c-Met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development // *J. Cell Biol.* 1993. Vol. 123(1). P. 223–235.

39. *Sottile V.* Bone marrow as a source of stem cells and germ cells? Perspectives for transplantation // *Cell and Tissue Research*, 2007. Vol. 328 (1). P. 1–5.

40. *Williams S., Anderson W.C., Santaguida M.T., Dylla S.J.* Patient-derived xenografts, the cancer stem cell // *Lab Invest*, 2013. Vol. 93. P. 970–982.

41. *Zeng W., Chen G., Kajigaya S., Nunez O., Charrow A., Billings EM, Young NS.* Gene expression profiling in CD34 cells to identify differences between aplastic anemia patients and healthy volunteers. // *Blood*, 2004. Vol. 103. P. 325–332.

42. *Zhao R.C., Liao L., Han Q.* Mechanisms and perspectives on the mesenchymal stem cell in immunotherapy // *J. Lab. Clin. Med.*, 2004. Vol. 143. P. 284–291.

XENOTRANSPLANTATION OF MICE-DONORS' STEM CELLS TO POIKILOTHERMIC AQUATIC ORGANISMS AS A METHOD OF CORRECTING PATHOLOGIES AND IMPROVING REPRODUCTIVE ACTIVITY

G.I. PRONINA^{1,2}, N.YU. KORYAGINA², A.A. IVANOV¹, A.O. REVYAKIN³,
O.I. STEPANOVA³

(¹ Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy;

² All-Russian Research Institute of Irrigational Fish Breeding;

³ Scientific Center for Biomedical Technologies, Federal Medical-and-Biological Agency)

The scope of application of embryonic and fetal stem cells (SCs) is limited due to their multi-directional differentiation in the recipient's organism and possible formation of teratomas and teratocarcinomas, as well as due to some ethical reasons. Therefore, adult stem cells (postnatal SCs) are more widely used. These cells are divided into hematopoietic, mesenchymal stromal, and tissue-specific progenitor cells-precursors. Hematopoietic stem cells (HSCs) are able to colonize and provide long-term self-support. Mesenchymal stromal stem cells are the precursors of a number of tissues and have a wide range of possible applications in regenerative medicine. Tissue-specific progenitor cells replace dead cells in the body and are responsible for tissue renewal. Hematopoietic stem cells are used for transplantation and specialized care for patients with various primary and recurrent

cancer, hematological, immunological and other diseases. The most effective method is autogenous transplantation, since the risk of transplant rejection is minimal. At present, the allotransplantation of SCs is widely used. However, it requires special training of the recipient and compatibility with the donor. Xenogenic stem cell transplantation is a promising but the least developed treatment method. This is due to the differences in the genotype and the fact that donor cells are not embedded in the recipient's body. It is shown that xenotransplantation of mammalian stem and progenitor cells to lower-vertebrate and invertebrate poikilothermic hydrobionts with artificially induced pathology leads to the regeneration and restoration of damaged organs. The stem cells of donor mice introduced into the organism of mature crayfish and axolotls stimulate the reproductive activity of recipients. Aquatic organisms can be potential sources of stem cells. The research results reveal the prospects of using stem cells in medical and veterinary practice.

Key words: postnatal stem cells, hematopoietic stem cells, xenogenic transplantation, hydrobionts, regeneration, stimulation of reproductive activity.

References

1. Gritsayev S.V., Pavlova I.Ye., Semenova N.Yu. Otdelnye aspekty transplantatsii gemopoeticheskikh stvolovykh kletok onkogematologicheskim bol'nym [Certain aspects of hematopoietic stem cell transplantation in onco-hematologic patients] // Vestnik gematologii, 2015. Vol. 11, no.3. Pp. 9–21. (In Russian)
2. Ivanov A.A. Ispolzovaniye organov zhivotnykh dlya transplantatsii cheloveku ksenotransplantologiya [Use of animal organs for human transplantation (xenotransplantation)]. In: Etologiya s osnovami zoopsihologii // SPb: Lan. 2013. Pp. 608–617. (In Russian)
3. Kasinskaya N.V., Stepanova O.I., Karkishchenko N.N., Karkishchenko V.N., Semenov Kh.Kh., Beskova T.B., Kapanadze G.D., Revyakin A.O. Dengina S.Ye. Gen zelenogo belka kak marker pri transplantatsii stvolovykh i progenitornykh kletok kostnogo mozga [Green protein gene as a marker for the transplantation of bone marrow stem and progenitor cells] // M.: Biomeditsina, 2011. No. 2. Pp. 30–34. (In Russian)
4. Korochkin L.I., Revishchin F.V., Okhotin V.E. Neirralnye stvolovyye kletki i ikh znachenie v vosstanovitelnykh processakh v nervnoy sisteme [Neural stem cells and their role in the regenerative processes in the nervous system]. Morfologiya. Obzornyye i obshcheteoreticheskiye stati. 2005. Pp. 7–16. (In Russian)
5. Krivorukho N.A. Osnovnyye svoystva i perspektivy primeneniya fetalnykh stvolovykh kletok [Main properties and prospects for the use of fetal stem cells] // Klinicheskaya meditsina Kazakhstana, 2012. No. 2 (25). Pp. 133–136. (In Russian)
6. Pronina G.I., Koryagina N.Yu., Revyakin A.O., Kapanadze G.D., Stepanova O.I., Baranova O.V., Kasinskaya N.V. Transplantatsiya kletok kostnogo mozga myshey rybam i rechnym rakam [Transplantation of the bone marrow cells of mice to fish and crayfish] // Mezhdunarodniy nauchno-issledovatel'skiy zhurnal sbornik po rezul'tatam VII za-ochnoy nauchnoy konferentsii Research Journal of International Studies. Yekaterinburg MNIZH, 2014. No. 1 (20) Part 1. Pp. 17–18. (In Russian)
7. Pronina G.I., Koryagina N.Yu., Revyakin A.O., Stepanova O.I., Kurishchenko Zh.O., Petrova N.V. Ispolzovanie gidrobiontov v kachestve alternativnykh biomodeley [Use of hydrobionts as alternative biomodels] // Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im I.M. Sechenova. SPb. 2017 Russian journal of physiology (formerly I.M. Sechenov Physiological Journal). 103 No. 8. Pp. 912–929. (In Russian)
8. Pronina G.I., Revyakin A.O., Koryagina N.Yu., Kapanadze G.D., Stepanova O.I., Kurishchenko Zh.O. Vliyaniye stvolovykh kletok na reproduktivnyuyu funktsiyu rechnykh rakov [Influence of stem cells on the reproductive function of crayfish] // Biomeditsina, 2015. No. 1. Pp. 81–84. (In Russian)

9. *Rasulov M.F.* Ispolzovaniye mezenhimalnykh stvolovykh kletok kostnogo mozga i embrionalnykh fibroblastov v lechenii ozhogovykh ran [Use of bone marrow mesenchymal stem cells and fetal fibroblasts in the treatment of burn wounds] // *Tikhookeanskiy med. zhurnal*, 2004. No. 1 (15). Pp. 7–9. (In Russian)

10. *Repin V.S., Saburina I.N.* Embrionalnye i vzroslye stvolovyye kletki: mesto v sovremennoy meditsine [Embryonic and adult stem cells: a role in modern medicine] // *Lab. meditsina* 2006. No. 8. Pp. 7–9. (In Russian)

11. *Romanenkov N.S., Movchan K.N.* Metodiki vydeleniya mezenkhimalnykh stvolovykh kletok iz autologichnoy zhirovoy tkani [Results of the use of mesenchymal stem cells from autologous adipose tissue in plastic and reconstructive surgery (literature review)] // *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2016. Series 11. Issue 4. Pp. 85–95. (In Russian)

12. *Stepanova O.I., Kasinskaya N.V., Baranova O.V., Semenov Kh.Kh., Revyakin A.O.* Metod kultivatsii i fenotipicheskaya kharakteristika gemopoeticheskikh kletok kostnogo mozga (mononuklearnoy fraktsii) ot donorov s genom zelenogo belka [Cultivation method and phenotypic characteristics of hematopoietic bone marrow cells (mononuclear fraction) from donors with the green protein gene]. // *M.: Biomeditsina*. 2013. No. 3. Pp. 91–94. (In Russian)

13. *Sukhinich K.K., Podgorniy O.V., Aleksandrova M.A.* Immunogistohimicheskiy analiz razvitiya suspenzionnykh i tkanevykh neirotransplantatov [Immunohistochemical analysis of the development of suspension and tissue neurotransplants] // *Izvestiya RAN. Seriya biologicheskaya* // *M.: Nauka*, 2011. No. 6. Pp. 659–669. (In Russian)

14. *Sukhikh G.G., Malaitseva V.V., Bogdanova I.M.* Perspektiva ispolzovaniya fetalnykh/progenitivnykh kletok cheloveka kletочноy terapii [Prospects of using fetal / progenetic cells of human for cell therapy] // *Kletочnye tekhnologii v biologii i meditsine*. Izd-vo RAMN, 2008. No. 1. Pp. 5–14. (In Russian)

15. *Havinson V.Kh., Kvetnoy I.M., Yuzhakov V.V., Popuchiev V.V., Konovalova S.S.* Peptidergicheskaya regulyatsiya gomeostaza [Peptidergic regulation of homeostasis]. SPb.: Nauka, 2003. 190 p. (In Russian)

16. *Yarygin E.I., Alyamovskiy V.V., Shestakova L.A.* Tekhnologiya polucheniya kontsentrata stvolovykh kletok pupovinnoy krovi dlya ispolzovaniya v stomatologii: metod, rekomendatsii dlya internov, ordinatorov po spetsialnosti “Stomatologiya obshchey praktiki” [Technology of obtaining umbilical cord blood stem cell concentrate for use in dentistry: method, recommendations for interns and resident physicians in the specialty “General Practice Dentistry”]. Krasnoyarsk: KrasGMU, 2014. 28 p. (In Russian)

17. *Ader M., & Tanaka E.M.* Modeling human development in 3D culture // *Current Opinion in Cell Biology*, 2014. Vol. 31. Pp. 23–28. (In English)

18. *Alvarez-Dolado M., Pardal R., Garcia-Verdugo J.M., Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A.* Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes // *Nature*, 2003. Vol. 425. Pp. 968–972. (In English)

19. *Banerjee M., Kumar A., Bhonde R.R.* Reversal of experimental diabetes by multiple bone marrow transplantation // *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 2005. Vol. 328(1). Pp. 318–325. (In English)

20. *Bjorklund A., Lindvall O.* Cell replacement therapies for central nervous system disorders // *Nature Neuroscience*, 2000. Vol. 3. Pp. 537–44. (In English)

21. *Bonnet D.* Hematopoietic stem cell niche, Vol. 1 // *Advances in stem cells and their niches*. English: Academic Press. 2017. 186 p. (In English)

22. *Chen L.B., Jiang X.B., Yang L.* Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells // *World J. Gastroenterol*, 2004. Vol. 10(20). Pp. 3016–3020. (In English)

23. Chiu C.H., Su L.H., Chu C., Chia J.H., Wu T.L., Lin T.Y., Lee YS, Ou J.T., Isolation of *Salmonella enterica* serotype choleraesuis resistant to ceftriaxone and ciprofloxacin // *Lancet*. 2004. Vol. 363 (9417). Pp. 1285–1286. (In English)
24. Gershon A.A., Steinberg S., Gelb L. Live attenuated varicella vaccine: protection in healthy adults in comparison to leukemic children. // *J. Infect. Dis.* 1990, Vol. 161. Pp. 661–666. (In English)
25. Greenbaum A., Hsu Y.M, Day R.B, Schuettpelz L.G, Christopher M.J, Borgerding J.N, Nagasawa T, Link D.C. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance // *Nature*, 2013. Vol. 495(7440). Pp. 227–30. doi: 10.1038/nature11926. (In English)
26. Haller MJ., Wasserfall CH, McGrail KM, Cintron M, Brusko TM, Wingard JR, Kelly SS, Shuster J.J, Atkinson MA, Schatz DA. Autologous umbilical cord blood transfusion in very young children with type 1 diabetes // *Diabetes Care*, 2009. Vol. 32(11):2041–2046. doi: 10.2337/dc09-0967. (In English)
27. Horwitz E.M., Gordon P.L., Koo W.K., Marx J.C., Neel M.D., McNall R.Y., Muul L. and Hofmann T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002. Vol. 99. P. 8932–8937. doi: 10.4236/oalib.1101505 (In English)
28. Izumida Y., Aoki T., Yasuda D. et al. Hepatocyte growth factor is constitutively produced by donor-derived bone marrow cells and promotes regeneration of pancreatic beta-cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 2005. Vol. 333(1). Pp. 273–282. (In English)
29. Johansen R., Needham J.R., Colquhoun. D.J., Poppe T.T., Smith A.J. Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research. // *Laboratory Animals*, 2006. Vol. 40. Pp. 323–340. (In English)
30. Keirstead H.S., Nistor G., Bernal G., Totoiu M., Cloutier F., Sharp K., Steward O. Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cell Transplants Remyelinate and Restore Locomotion after Spinal Cord Injury // *Journal of Neuroscience*, 2005, Vol. 25(19) 4694–4705; doi: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0311-05.2005> (In English)
31. Kinnaird T., Stabile E., Burnett M.S, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms // *Circ. Res*, 2004. Vol. 94(5). Pp. 687–692. (In English)
32. Lee R.H., Seo M.J., Reger R.L. Spees JL, Pulin AA, Olson SD, Prockop D.J. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice/USA // *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2006. Vol. 103(46). Pp. 17438–17443. (In English)
33. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 1990 Vol. 60(4). Pp. 585–95. (In English)
34. Ohga S., Kudo K., Ishii E. Honjo S, Morimoto A, Osugi Y, Sawada A, Inoue M, Tabuchi K, Suzuki N, Ishida Y, Imashuku S, Kato S, Hara T. Hematopoietic stem cell transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. // *Pediatr Blood Cancer*, 2010. Vol. 54. Pp. 299–306. (In English)
35. Pettinger M.F., Martin B.J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics // *Circ. Res*, 2004. Vol. 95. Pp. 9–20. (In English)
36. Pronina G.I., Koryagina N.Yu., Revyakin A.O., Stepanova O.I., Kurischenko J.O., Petrova N.V. Recovery of the organism of poikilothermic hydrobionts using mammalian stem cells // *Human & Veterinary Medicine Open Access International Journal of the Bioflux Society*, 2018. Vol. 10. Issue 1. Pp. 10–15. (In English)

37. Rais Y., Zviran A., Geula S., Gafni O., Chomsky E., Viukov S., Mansour A.A.F., Caspi I., Krupalnik V., Zerbib M., Maza I., Mor N., Baran D., Weinberger L., Jaitin D.A., Lara-Astiaso D., Blecher-Gonen R., Shipony Z., Mukamel Z., Hagai T., Gilad S., Amann-Zalcenstein D., Tanay A., Amit I., Novershtern N., Hanna J.H. Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency // *Nature*, 2013. Vol. 502(7469). Pp. 65–70. doi: 10.1038/nature12587 (In English)

38. Sonnenberg E., Meyer D., Weidner K.M., Birchmeier C. Scatter factor hepatocyte growth factor and its receptor, the c-Met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development // *J. Cell Biol.* 1993. Vol. 123(1). Pp. 223–235. (In English)

39. Sottile V. Bone marrow as a source of stem cells and germ cells? Perspectives for transplantation // *Cell and Tissue Research*, 2007. Vol. 328 (1). Pp. 1–5. (In English)

40. Williams S., Anderson W.C., Santaguida M.T., Dylla S.J. Patient-derived xenografts, the cancer stem cell // *Lab Invest*, 2013. Vol. 93. Pp. 970–982. (In English)

41. Zeng W, Chen G, Kajigaya S., Nunez O, Charrow A, Billings EM, Young NS. Gene expression profiling in CD34 cells to identify differences between aplastic anemia patients and healthy volunteers. // *Blood*, 2004. Vol. 103. Pp. 325–332. (In English)

42. Zhao R.C., Liao L., Han Q. Mechanisms and perspectives on the mesenchymal stem cell in immunotherapy // *J. Lab. Clin. Med.*, 2004. Vol. 143. Pp. 284–291. (In English)

Пронина Галина Иозеповна, доцент, доктор биологических наук. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная Академия (МСХА) имени К.А. Тимирязева. 127550 г. Москва, ул. Тимирязевская, 49. Email: gidrobiont4@yandex.ru, телефон: 8 (903) 173-62-47.

Заведующая лабораторией – главный научный сотрудник Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства». 142460. Московская обл., г. Ногинск, рабочий пос. Им. Воровского, ул. Сергеева, д. 24.

Корягина Наталья Юрьевна, старший научный сотрудник, кандидат биологических наук. Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства». 142460. Московская обл., г. Ногинск, рабочий пос. Им. Воровского, ул. Сергеева, д. 24. Email: natalykoryagin@yandex.ru, телефон: 8 (903) 173-62-49.

Иванов Алексей Алексеевич, заведующий кафедрой, доктор биологических наук, профессор. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная Академия (МСХА) имени К.А. Тимирязева. 127550 г. Москва, ул. Тимирязевская, 49. Email: ayvanov@timacad.ru, телефон: 8 (916) 793-96-75.

Ревякин Артем Олегович, заведующий лабораторией, кандидат биологических наук. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Научный центр биомедицинских технологий» Федеральное медико-биологическое агентство. 143442, Московская область, Красногорск ГО, поселок Светлые горы, д 1. Email: ar_info@mail.ru, телефон: 8 (903) 172-60-04.

Степанова Ольга Ивановна, заведующая лабораторией, кандидат биологических наук. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Научный центр биомедицинских технологий» Федеральное медико-биологическое агентство. 143442, Московская область, Красногорск ГО, поселок Светлые горы, д 1. Email: ar_info@mail.ru, телефон: 8 (495) 561-52-64.

Galina I. Pronina, Associate Professor, DSc (Bio) Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy. 127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49. E-mail: gidrobiont4@yandex.ru, phone: 8 (903) 173-62-47.

Head of the Laboratory – Chief Research Associate, All-Russian Research Institute of Irrigation Fish Farming. 142460, Moscow Region, Noginsk, Im. Vorovskogo Settlement, Sergeyeva Str., 24.

Nataliya Yu. Koryagina, Senior Research Associate, PhD (Bio). All-Russian Research Institute of Irrigation Fish Farming. 142460, Moscow Region, Noginsk, Im. Vorovskogo Settlement, Sergeyeva Str., 24. E-mail: natalykoryagin@yandex.ru, phone: 8 (903) 173-62-49.

Aleksei A. Ivanov, Head of the Department, DSc (Bio), Professor. Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy. 127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49. E-mail: ayvanov@timacad.ru, phone: 8 (916) 793-96-75.

Artem O. Revyakin, Head of the Laboratory, PhD (Bio). Federal Scientific Center for Biomedical Technologies, Federal Medical-and-Biological Agency. 143442, Moscow Region, Krasnogorsk, Svetlye Gory, 1. E-mail: ar_info@mail.ru, phone: 8 (903) 172-60-04.

Olga I. Stepanova, Head of the Laboratory, PhD (Bio). Federal Scientific Center for Biomedical Technologies, Federal Medical-and-Biological Agency. 143442, Moscow region, Krasnogorsk, Svetlye Gory, 1. E-mail: ar_info@mail.ru, phone: 8 (495) 561-52-64.