

ОБЗОРЫ

УДК 616.34:577.29

©Коллектив авторов

ГДЕ ЛОКАЛИЗОВАНЫ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КИШЕЧНОГО ЭПИТЕЛИЯ? О МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРАХ

**С.Я. Проскуряков*, А.Г. Коноплянников, Ю.Г. Верховский,
Л.П. Ульянова, А.Ф. Цыб**

Учреждение Российской академии медицинских наук Медицинский
радиологический научный центр РАМН, 249036 Обнинск, ул. Королева, д. 4;
тел./факс: 8(48439)7-4496, 8(48439)7-4863, 8(495)956-1440;
эл. почта: pros@mrrc.obninsk.ru

На примере кишечного эпителия в обзоре рассматривается новая история и методология поиска стволовых клеток (СК) в ткани взрослых организмов, найденных и у *Homo sapiens* и у *Drosophila melanogaster*, и отличающаяся рождением ряда оригинальных гипотез, объясняющих их необычные свойства. Исключительный прогресс в этом направлении (2008-2010 годы) достигнут благодаря применению новых методов соматической рекомбинации для длительной регистрации различных линий дифференцированных клеток – ранних и отдалённых потомков СК. 1) Хотя уже около 40 лет известна анатомическая локализация клеток кишечного эпителия, у которых отсутствуют выраженные морфологические и биохимические маркеры дифференцировки – нижняя треть крипт тонкого и толстого кишечника, до последнего времени, результаты их экспериментальной идентификации, изоляции и определения функциональных характеристик являются предметом дискуссий. В частности, неясно, какие СК участвуют в регенерации крипты: те же, что и в гомеостатическом обновлении, или разные их субпопуляции, или ранние потомки СК, приобретающие стволовые свойства путем репрограммирования? 2) Кроме того, выявленные биохимические маркеры потенциальных СК в своём большинстве являются общими и для СК других тканей эмбрионального и зрелого организма, что позволяет использовать при их выделении методы, разработанные для кишечного эпителия. 3) Данные о том, что новообразования в эпителии кишечника (полипы и неоплазии), индуцируются мутациями генов, кодирующих маркеры СК и содержат характерные биохимические характеристики потенциальных стволовых клеток, свидетельствуют в пользу гипотезы происхождения стволовых раковых клеток из нормальных СК или их ближайших потомков. В целом, представленные в обзоре факты могут быть полезны как при разработке оптимальных методов использования СК в клеточной терапии (как источники гуморальных факторов) и регенеративной медицине (как источники дифференцированных клеток для восстановления поражённой ткани), так и для целенаправленного поиска противоопухолевых средств (опухолевые СК как мишень) и препаратов, модифицирующих генетические и эпигенетические реакции СК на генотоксические и стрессовые воздействия.

Ключевые слова: стволовые клетки, эпителий кишечника, маркеры.

ВВЕДЕНИЕ. Почти 40 лет прошло со дня опубликования данных о составе и функциях клеток эпителия тонкого кишечника млекопитающих, обеспечивающих его самообновление на протяжении всей жизни и регенерацию вследствие патофизиологических причин (инфекция, воспаление) или экзогенных повреждающих воздействий (резекция кишечника, ионизирующая радиация, энтеротоксины), однако до последнего времени, результаты их экспериментальной идентификации, изоляции и определения функциональных характеристик остаются дискуссионными. Подобная ситуация складывается и в исследованиях более простой модели – пищеварительного тракта *Drosophila melanogaster* [1, 2].

В экспериментах с облучёнными мышами было показано, что восстановление кишечного эпителия начинается размножением клеток расположенных

* - адресат для переписки

ЛОКАЛИЗАЦИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КИШЕЧНОГО ЭПИТЕЛИЯ

в нижней трети крипт Люберкюна (Lieberkühn), которое можно зарегистрировать через 3-4 дня по образованию своеобразных “микроколоний” - скоплений 6-10 пролиферирующих клеток [3, 4]. Эти данные свидетельствовали о том, что целостность и клеточный состав кишечного эпителия, содержащего, главным образом, клетки Панета, выделяющие антибактериальные пептиды, секретирующие слизь клетки Гоблета, энтероэндокринные клетки и поглощающие питательные вещества энтероциты, поддерживается делением и последующей дифференцировкой клеток, содержащихся в пуле стволовых клеток (СК) [5, 6]. Морфологический анализ клеток, выстилающих крипты тонкого кишечника, показал, что в нижней части крипты встречаются наименее дифференцированные клетки по сравнению с дифференцированными клетками 3-х секреторных и одной адсорбтивной линии эпителиоцитов, которые находятся по преимуществу (кроме клеток Панета) в верхних отделах крипты и на кишечной ворсинке [7-10].

В настоящее время в стволовом компартменте крипты выделяют две области локализации клеток, характеризующихся отсутствием морфологических и биохимических признаков терминально дифференцированных (TD) эпителиоцитов [11, 12]. Такие клетки обнаружены на дне крипты, главным образом среди клеток Панета и изредка встречаются сразу выше них на 2-3 клеточных диаметра (CBC, columnar base cells), а также на уровне 2-7 клеточных диаметров (в среднем позиция +4) выше дна крипты (рисунок).

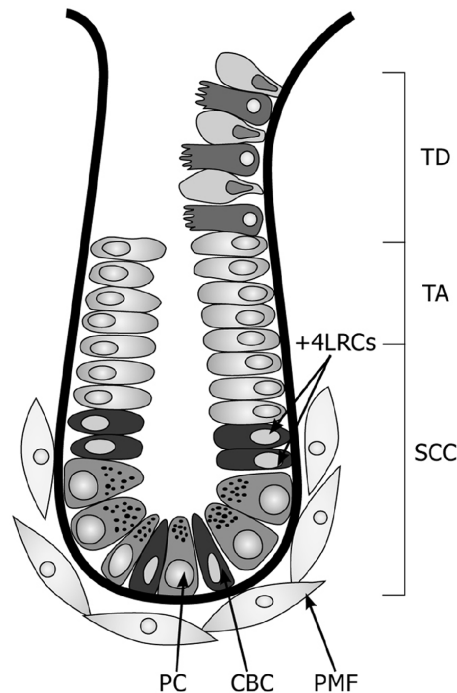


Рисунок.

Схема, отображающая основные особенности строения крипт, углублений в стенке тонкого кишечника, в которых расположены: стволовые клетки (СК) кишечного эпителия, их ранние потомки и ближайшее микроокружение (показано не полностью). В нижней трети крипт тонкого кишечника, обозначенной как стволовой компартмент (SCC), присутствует несколько видов клеток, предположительно участвующих в гомеостатическом и регенеративном обновлении кишечного эпителия. Во первых, это СК, по-видимому, состоящие из двух популяций недифференцированных клеток. Одни СК расположены, главным образом, на дне крипты среди клеток Панета (PC) - CBC (columnar base cells). Другие СК с большей частотой встречаются в позиции на 4 клеточных диаметра выше дна крипты - +4LRC (long-time label retention cells). Далее вверх по крипте располагается популяция быстропролиферирующих ранних потомков СК (TA, transit-amplifying cells), наиболее ранние из которых могут также принимать участие в регенерации эпителия после цитотоксического воздействия. Более коммитированная часть TA является источником терминально дифференцированных (TD) эпителиоцитов. Непосредственно к базолатеральной мембране крипты прилегают перикрипальные миофибробласты (PMF).

По ряду нижеописанных характеристик эти популяции СК не идентичны. Среди клеток в позиции +4 обнаружены клетки с аномально высокой радиочувствительностью ($D_0 = 0,25$ Гр). Предполагается, что это может быть одним из механизмов элиминации даже незначительно поврежденных СК кишечного эпителия, который предотвращает возможную инициацию канцерогенеза [6].

Кроме того, клетки, расположенные в среднем в позиции +4, в отличие от CBC, способны включать и длительное время сохранять меченые предшественники (^3H -тимидин, BrdU) в составе ДНК (+4LRC, long-time label retention cells). Гибель этих клеток у гамма-облученных животных прямо коррелирует со стерилизацией крипт, т.е., с их неспособностью к пострадиационной регенерации с образованием “микроколоний” [13]. С помощью проточной цитометрии было показано, что в суспензии дезагрегированных эпителиоцитов клетки LRC составляют до 7% популяции пролиферирующих клеток эпителия толстого кишечника крыс и период их полуобновления составляет более 70 дней [14]. Клетки, расположенные выше клеток +4LRC, быстро пролиферируют (TA, transit-amplifying cells), поэтому ДНК-метка в них разбавляется с каждым делением и, в конечном итоге, уносится со сдвигающимися с ворсинок терминально дифференцированными эпителиоцитами [15-17]. СК, способные удерживать в течение долгого времени пролиферативную метку (LRC), т.е. находящиеся в состоянии пролиферативного покоя (G_0 -фаза или длительный G_1 -период), были обнаружены и в других клеточных системах тканевого обновления мышей – кроветворная, волосные фолликулы [18, 19].

Механизм, позволяющий длительное время сохранять меченые предшественники в ДНК СК крипт тонкого кишечника, остается дискуссионным. Предполагается, что в СК эпителия кишечника, возможно, происходит избирательная сегрегация материнских нитей ДНК в стволовой клетке в результате асимметричного деления [20]. Однако в гемопоэтических стволовых клетках нити ДНК распределяются равномерно между дочерними клетками [21], хотя и среди этих клеток обнаружены 2 субпопуляции СК с различными свойствами и микроокружением [22].

Убедительными выглядят и менее оригинальные объяснения данного феномена. Например, метка может реутилизироваться и/или сохраняться в долгоживущих дифференцированных потомках (клетки Панета или их предшественники [23], энтероэндокринные клетки или субэпителиальные лимфоциты [12]), хотя аналогичного явления у покоящихся гемопоэтических стволовых клеток не обнаружено. Следует подчеркнуть, что на дне крипты или в позиции +4 располагается лишь основная часть соответствующих потенциальных СК, а отдельные редкие клетки, как СК, так и их коммитированные потомки могут встречаться и в других позициях, как например, клетки Панета от 1 до 4 позиции [13], а в области их локализации обнаруживается до 40% клеток LRC [24].

С этими двумя основополагающими гипотезами о локализации СК (клетки CBC и +4LRC) и были связаны все последующие направления поиска их специфических маркеров. В силу ряда ограничений в применяемых методиках регистрации СК, в дальнейшем будут употребляться термины: потенциальные стволовые клетки (пСК) или клоногенные клетки крипт (ККК).

Поиск новых биохимических маркеров СК эпителия кишечника в последнее время существенно интенсифицировался (таблица) [1, 25]. Их выбор в основном диктовался данными об экспрессии определенного спектра генов в клетках эмбриональных тканей и злокачественных новообразований, а также в СК других тканей взрослого организма [26-30], особенно генов, включённых в Wnt-сигнальную сеть [11, 31-34].

ЛОКАЛИЗАЦИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КИШЕЧНОГО ЭПИТЕЛИЯ

Таблица. Молекулярные маркеры стволовых клеток кишечного эпителия.

Маркеры стволовых клеток	Локализация клеток в крипте, коэкспрессия других маркеров	Литература
Bmpr1α (bone morphogenetic protein receptor)	Позиция 4-6	[32, 34]
phospho-Pten (phosphatase homologue of tensin)	Позиция 4-6, энтероэндокринные клетки	[11, 34]
ErbB2 – тирозин-киназный рецептор	Позиция 4-6	[25, 35, 36]
ErbB3 – тирозин-киназный рецептор	Основание	
β1-Интегрин – группа рецепторов, обеспечивающая адгезию к подстилающему экстраклеточному матриксу	Нижняя треть крипты	[37, 38]
Dcamk11 (double cortin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase-like-1/Mapk14)	Позиция 4-6; Msi-1 ⁺	[36, 39]
Msi-1 – м-РНК-связывающий белок, ингибирует транскрипцию гена <i>mNumb</i> и подавляет экспрессию генов, специфических для клеток Пенета	Позиция 4-6, среди клеток Пенета; ТА популяция*	[33, 40-42]
Теломераза, обратная транскриптаза	Позиция 4-6	[12, 43, 44]
Lrg5 (orphan leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled receptor 5, Gpr49) – рецептор, подобный рецепторам TSH, FSH и LH, у которых лигандами являются гликопротеиновые гормоны	Основание, среди клеток Пенета, Asc12 ⁺ , Olfm4 ⁺	[53-55, 57, 58]**
Prom1 (prominin 1/CD133) – трансмембранный гликопротеин	Позиция 0-2; Lrg5 ⁺ , ТА популяция	[61]**
Bmi1 – компонент комплекса (polycomb-repressing complex 1, PRC1), подавляющего активность хроматина	Позиция 4-6	[63]**
Hoechst-33342⁻ (side population) – клетки, неокрашиваемые Hoechst-33342	Msi-1 ⁺ , β 1-интегрин ⁺	[23, 70]

Примечание: * - ТА популяция клеток (transit-amplification cells); ** - показано, что СК, экспрессировавшие эти маркеры, продуцировали все 4 линии дифференцированных эпителиоцитов.

Bmpr1α (bone morphogenetic protein receptor) и phospho-Pten (phosphatase and tensin homolog) – важные компоненты Wnt-системы в криптах тонкого кишечника. Мутации в *Bmpr1α* и *Pten* сопровождаются интестинальным полипозом. *Bmpr1α* и phospho-Pten были зарегистрированы в клетках нижней части крипты и, в том числе, в клетках +4LRC [35, 36]. Вместе с phospho-Pten в этих клетках наблюдалась коэкспрессия Wip1-фосфатазы, важного регулятора канцерогенеза [24]. Однако phospho-Pten был замечен также в постмитотических энтероэндокринных клетках [37].

Рецепторы EphB2 и EphB3 (ephrin receptor) участвуют в эмбриогенезе и канцерогенезе. У *EphB2*^(-/-) и *EphB3*^(-/-) мышей нарушается нормальная миграция дифференцированных клеток, в частности, клетки Панета обнаруживались на ворсинке. EphB2 наиболее значительно был экспрессирован на мембране клеток, расположенных в позиции 4-6 от основания крипты. EphB3 регистрировался главным образом в клетках основания крипты, а также в клетках Панета [28, 38, 39].

Интегрины – семейство гетеродимерных трансмембранных гликопротеинов, обеспечивающих прикрепление эпителиальных клеток к базальной мембране стенки кишечника с помощью их лигандов: ламинина, фибронектина и коллагена. α2β1-Интегрин был обнаружен преимущественно в стволовом компартменте крипты [40, 41]. Для выделения пСК из крипт кишечника мышей с помощью проточной цитометрии были использованы антитела к β1-интегрину. При этом клетки β1-интегрин⁺ оказались высоко клоногенными и образовывали *in vitro* в 3 раза больше колоний, чем клетки из исходной суспензии [41].

Dcamk1l (doublecortin and CaM kinase-like-1) – белок, ассоциированный с микротрубочками, ранее был обнаружен в постмитотических нейронах. Клетки Dcamk1l⁺ расположены выше дна крипт тонкого кишечника, около 4-ой клеточной позиции по оси крипты (т.е., там, где локализованы +4LRC). Они редко встречаются на дне крипты и на стыке крипты и ворсинки. Такие клетки также замечены в желудке и толстом кишечнике. Клетки Dcamk1l⁺, по-видимому, являются подклассом клеток Msi1⁺. Эти клетки не метятся BrdU и в норме, вероятно, являются фракцией покоящихся ККК. Облучение животных в дозе 6 Гр вызывало через 6 ч апоптотическую деструкцию клеток (p53-зависимый апоптоз) в нижней трети крипты, но не Dcamk1l⁺. Через 24 ч после облучения наблюдались лишь единичные апоптотические клетки Dcamk1l⁺. В то же время в таких клетках отмечались митотические фигуры, свидетельствовавшие о выходе клеток из радиационно-индуцированного блока деления и вступлении в пролиферацию. В регенерирующих криптах через 3,5 сут после облучения мышей в дозе 12 Гр, когда большая часть животных начинает погибать по “кишечному” варианту лучевой гибели, клетки Dcamk1l⁺ не наблюдались и появлялись лишь на 7 сут. у оставшихся живыми к этому сроку животных [39, 42].

Msi1 (Musashi-1) – мРНК-связывающий белок, действующий как трансляционный репрессор. У *Drosophila* он является регулятором асимметричного деления нейрональных СК. Мыши, лишенные *Msi1*, не проявляют каких-либо дефектов в развитии кишечника. Вместе с Msi1 в мышинном и в человеческом эпителии в нижней части крипт найден Hes1 (hairy and enhancer of split homologue-1) – белок, необходимый для дифференцировки секреторных линий эпителиоцитов [43]. Однако Msi1 обнаружен не только на дне крипты и в клетках +4LRC, но и в клетках Ki67⁺, т.е., в ТА популяции. По-видимому, Msi1 неспецифичен для пСК, а также маркирует их ближайших пролиферирующих потомков [36, 44]. Интересно, что конститутивная экспрессия *Msi1* в линии эпителиоцитов человека, подавляла экспрессию генов, специфичных для клеток Панета, в том числе *Pla2G2A*. В кишечнике человека экспрессия обоих генов (*Msi1*, *Hes1*) была обнаружена в клетках дна крипт, но не в клетках Панета и не в CBC [45].

Высокая экспрессия теломеразного комплекса является характерным признаком СК во многих тканях, предохраняя эти клетки от старения. Было предположено, что и для СК кишечника, имеющих уникальное долгожительство (потенциально более 1000 делений), этот комплекс может быть маркером [16, 46]. Недавно были получены трансгенные мыши, у которых компонент теломеразы – обратная транскриптаза была мечена флуоресцентным белком и экспрессировалась в криптах в клетках +4LRC [47]. Однако, идентификация СК (и их репликативного старения) на основе длины теломер или теломеразной активности у мышей, по-видимому, спорна [6, 48] по причине аномальной длины теломер и несоответствия этой длине активности фермента [49-51].

Наиболее убедительные доказательства идентификации пСК опубликованы лишь в последнее время. Это связано с внедрением в генно-инженерную технику новых методов соматической рекомбинации и, в частности, Cre-lox системы, позволяющей индуцировать экспрессию репортерных молекул (флуоресцирующие белки или LacZ) в исследуемом аллеле у взрослых животных [52, 53]. С использованием этого подхода показано, что клетки, содержащие белки *Lgr5*, *Ascl2*, *Prom1* и *Bmi1*, проявляют стволовые свойства, а именно, они длительное время сохраняются в стволовом компартменте (самообновляются) и продуцируют дифференцированные потомки всех 4 линий эпителиоцитов тонкого кишечника.

Ген *Lgr5* кодирует рецептор (orphan leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled receptor 5, Gpr49), подобный рецепторам TSH, FSH и LH, у которых лигандами являются гликопротеиновые гормоны. Его экспрессия находится под контролем Wnt-сигнальной сети [54], однако функции этого рецептора пока неясны. Следует добавить, что рецептор *Lgr5* экспрессируется также в костном мозге [55], а стволовые клетки гемопоэтического происхождения найдены и в кишечном эпителии [56, 57].

Клетки *Lgr5*⁺, визуализированные в трансгенных мышях коэкспрессией EGFP (enhanced green fluorescent protein) в исследуемом аллеле, были обнаружены на дне крипты среди клеток Панета. Они соответствовали клеткам СВС и имели биохимические, морфологические и ультраструктурные признаки недифференцированных клеток, т.е. признаки пСК. Эти клетки давали все дифференцированные линии эпителиоцитов, наблюдавшиеся до 2 месяцев по экспрессии репортерного аллеля *Rosa26-LacZ* [58]. Кроме того, клетки *Lgr5*⁺, регистрировались на дне крипт в течение 14 мес, что свидетельствовало об их способности к самоподдержанию стволовой популяции [58]. Подобное распределение *Lgr5*⁺ клеток среди клеток Панета также было зарегистрировано в криптах кишечника человека, хотя в значительной части крипт такие клетки отсутствовали. При этом они не совпадали с клетками, содержащими другой потенциальный маркер СК - *Prom1/CD133*, хотя и были расположены рядом [59]. Важно, что в клетках *Lgr5*⁺ также были высоко представлены по сравнению с вышележащими клетками крипты такие потенциальные маркеры СК как *CD44*, *EphB2*, *EphB3*, *Ascl2* (*Achaete scute-like-2*), *Olfm4* (*Olfactomedin-4*), *Sox9* (*SRY-related high-mobility-group box 9*) [60-62].

Наиболее убедительные доказательства того, что клетки *Lgr5*⁺ представляют собой СК кишечного эпителия мышей были получены в экспериментах по изоляции и культивированию этих клеток в специальных условиях (искусственная матрица, ростовые факторы). Через 2 недели культивирования эти клетки образовывали структуры типа крипта-ворсинка, в которых регистрировались и СК (их можно было снова культивировать с тем же эффектом) и их дифференцированные потомки всех 4 линий эпителиоцитов. Хотя следует отметить, что только 6% *Lgr5*⁺ были способны образовывать такие колонии [63].

Подобные данные были получены при изоляции подкласса *CD24*⁺ клеток кишечного эпителия, экспрессировавших *Sox9*^{Low} (*SRY-related high-mobility-group box 9*). Эти клетки также образовывали, примерно с той же частотой, крипто-подобные структуры *in vitro*, в отсутствие мезенхимального компартмента – “клеточной “ниши” для СК [64].

Prom1 (prominin 1/CD133) - трансмембранный гликопротеин, был использован ранее для выделения нейрональных, гемопоэтических и эндотелиальных клоногенных клеток. В биопсии глиобластомы человека этот белок характеризовал радиорезистентную фракцию стволовых опухолевых клеток [65]. В противоположность большинству тканей мышей, где он определяется и в дифференцированных клетках, в тонком кишечнике Prom1 регистрировался в недифференцированных клетках, расположенных на дне крипты среди клеток Панета. При этом Prom1 присутствовал в 75% клеток Lgr5⁺, т.е. вместе с другим маркером пСК, что свидетельствует в пользу стволовых свойств клеток Prom1⁺. Это подтверждается также обнаружением в срок до 60 дней дифференцированных клеток всех 4-х линий кишечного эпителия, происходящих из клеток Prom1⁺ в крипте и ворсинках. Кроме того, если в трансгенных мышах, содержащих клетки Prom1⁺, инициировали появление аденом кишечника, путем экспрессии мутантного бета-катенина, то маркер Prom1 регистрировался в опухолевых клетках. Этот факт, по-всей видимости, отражал явление неопластической трансформации СК эпителия кишечника [66]. Однако более поздние эксперименты в лаборатории Н. Clevers лишь частично подтвердили вышеописанные данные. Клетки Prom1⁺ регистрировались в большей степени в позициях 2, 4 и 5 от дна крипты, что соответствует, по мнению авторов, популяции ближайших потомков СК (Lgr5⁺) и ТА клеткам, а стволовые свойства клеток Prom1+Lgr5⁻ пока остаются дискуссионными [60].

Bmi1 представляет собой компонент комплекса (polycomb-repressing complex 1, PRC1), участвующего в эпигенетической регуляции генной экспрессии путём поддержания неактивного состояния хроматина [67]. В предположении, что этот комплекс необходим для самообновления СК и подавления их дифференцировки были получены трансгенные мыши, в которых вместе с Bmi1 коэкспрессировалась репортерная молекула (LacZ). Большая часть таких клеток локализовалась в положении 4 от дна крипты, хотя около 6% пСК было найдено и среди клеток Панета. В отличие от клеток Lgr5⁺ клетки Bmi1⁺ в основном наблюдались в криптах двенадцатиперстной кишки и имели более медленный клеточный цикл. Bmi1 экспрессирующие клетки давали все линии дифференцированных эпителиоцитов, наблюдавшиеся до 12 месяцев после индуцированной коэкспрессии флуоресцирующего белка [68]. Этот маркер также обнаружен в субпопуляции ацинарных панкреатических клеток, обладающих стволовыми свойствами [69].

Исключительное фундаментальное значение имеет решение проблемы выделения (деагрегации), обогащения и культивирования СК, способных к дифференцировке *in vitro* во все линии клеток эпителия кишечника [12, 70, 71]. Важно, что выявленные биохимические маркеры потенциальных СК в своём большинстве являются общими и для СК других тканей эмбрионального и зрелого организма, что позволяет использовать при их выделении методы, разработанные для эпителия пищеварительного тракта [32, 72]. Кроме того, это связано с большими надеждами на применение СК в клеточной терапии и регенеративной медицине. Однако эта задача пока еще далека от разрешения, хотя первые успешные работы в этом направлении уже опубликованы [63, 64]. Ниже будут рассмотрены и другие перспективные подходы.

Традиционные методы, используемые для выделения СК, основываются главным образом на проточной цитометрии с использованием комбинации антител к поверхностным антигенам. Таким образом, например, были идентифицированы, очищены и функционально охарактеризованы гемопоэтические СК [73]. Один из экстраклеточных маркеров β 1-интегрин был использован для выделения пСК с помощью проточной цитометрии [41].

Однако наиболее удобным методом обогащения клеточной суспензии пСК, по-видимому, является сортировка клеток с использованием доступных и неспецифических признаков, общих для многих видов СК [74].

Одним из таких маркеров является высокая экспрессия детоксифицирующих систем. Одна из них, в частности, направлена на экспорт из СК ксенобиотиков и характеризуется активностью белков-транспортеров типа ABCG2/BCRP1 (ATP-binding cassette (ABC) subfamily G member 2/breast cancer resistance protein 1). Селекция клеток по признаку удаления из них проникающего флуоресцирующего соединения Hoechst 33348, показывает, что такая популяция клеток (SP, side population) существенно обогащена клоногенными клетками. Хотя следует заметить, что подобной активностью отличаются не только СК нормальных или опухолевых тканей, но и некоторые виды дифференцированных клеток [75].

Фракционирование эпителиоцитов показало, что SP клетки, выделенные из кишечника мышей, остаются в условиях *in vitro* живыми до 14 дней и обогащены Msi1, маркером пСК [76]. В другом исследовании SP клетки (примерно 0,7% суспензии клеток) изолировали из крипт, полученных из кишечника человека. Они содержали маркеры Prom1/CD133, Dcamk11 и Msi1, прилипали к монослою миофибробластов в присутствии антител к β 1-интегрину, хотя их большая часть экспрессировала β 1-интегрин. Кроме того, эти клетки были значительно меньше по размеру (<10 мкм), чем миофибробласты [77]. Возможно, эти клетки относятся к одному из видов малых мультипотентных эмбрионально-подобных стволовых клеток (VSEL, very small embryonic like stem cell [78]), функция которых пока неизвестна.

ABC белки - не единственные цитопротективные молекулы. Обнаружено значительное содержание в СК зрелых тканей другого большого семейства детоксифицирующих белков – альдегиддегидрогеназ (ALDH), ферментов, окисляющих внутриклеточные альдегиды и играющих важную роль в метаболизме этанола, витамина А и циклофосамида [79]. С использованием витального красителя DAAA (dansylaminoacetaldehyde) в комбинации в низком боковым рассеянием (SSC, характеризует недифференцированные клетки с отсутствием или небольшим числом органелл и выпячиваний), клоногенные клетки крипт (ККК) были выделены и из нормального и малигнизированного эпителия кишечника человека [74, 80, 81].

Ещё одним механизмом, обеспечивающим резистентность СК к токсинам, может быть существенно сниженная экспрессия определенных гемопротеинов из класса P450-ферментов, включенных в окислительный метаболизм [82]. Однако ККК кишечного эпителия пока еще не были охарактеризованы подобным образом.

В целом, результаты исследований по поиску маркеров свидетельствуют о том, что имеются по крайней мере две группы пСК, различающиеся по своей локализации в крипте. Одни маркеры (EphB2, β 1-интегрин, Msi1, Bmpr1 α , phospho-Pten, Dcamk11, Bmi1) в относительно большей степени характеризуют пСК около 4-ой клеточной позиции. Другие маркеры (EphB3, Lgr5, Prom1) более представлены в клетках, расположенных у дна крипты и среди клеток Панета. Следует также отметить, что некоторые маркеры встречаются в клетках рассеянных по крипте и в дифференцированных клетках, например, в клетках Панета или энтероэндокринных [14, 25]. Кроме положения в крипте, обнаружены и другие различия в свойствах пСК, экспрессирующих различные маркеры. Так, в отличие от клеток Lgr5⁺, клетки Bmi1⁺ имеют более замедленный клеточный цикл [68]. Более медленный цикл, по-видимому, у клеток Lgr5⁺ толстого кишечника по сравнению с таковыми в тонком кишечнике [58].

Таким образом, можно констатировать, что в решении проблемы идентификации, изоляции и функциональной верификации СК кишечника, обеспечивающих гомеостатическое обновление эпителия на протяжении всей постнатальной жизни, достигнут существенный прогресс. Тем не менее остаются неясными ответы на ряд вопросов: 1) являются ли эти пСК, характеризующиеся различными маркерами, общими для всего желудочно-кишечного тракта или специфическими для его различных отделов и 2) являются ли эти пСК общими и для процесса гомеостатического самообновления и для регенерации кишечного

эпителия после цитотоксического воздействия [12, 83, 84] или после резекции части кишечника [85, 86].

Например, клетки $Bmi1^+$ в основном наблюдались в криптах двенадцатипёрстной кишки. Когда часть крипт, содержащих такие клетки опустошалась путем коэкспрессии дифтерийного токсина, то через 9-15 мес клеточное содержимое крипт у мышей восстанавливалось до уровня контроля [68]. Это свидетельствует о том, что регенерацию крипт, в отличие от самообновления, обеспечивают другие пСК ($Bmi1^-$). Такая же интерпретация напрашивается и для результатов наблюдения за пСК $Dcamk11^+$ в криптах кишечного эпителия у облученных (12 Гр) животных. В регенерирующих в ранние сроки после облучения криптах клеток $Dcamk11^+$ обнаружено не было. Они появлялись лишь на 7-ые сутки после облучения [42].

Это предположение поддерживается и данными, полученными при исследовании реакции кишечника *Drosophila melanogaster* на повреждающее воздействие (инфекция, оксидативный стресс). В нормальном обновлении и регенеративной реакции одного из отделов кишечника (hindgut) принимают участие две различные популяции клеток [87-89].

Перспективная концепция, дающая конструктивное направление для поиска маркеров других пСК, способных участвовать в регенерации поврежденного эпителия кишечника была выдвинута Dov Zipori [90]. Он предложил считать определяющим фундаментальным свойством СК их способность к “пластичности”, т.е. к дедифференцировке или трансдифференцировке, под действием некоторых факторов, а свойства самообновления и иерархичность популяции СК – факультативными признаками.

Применимость феномена “пластичности” для СК эпителия кишечника поддерживается рядом наблюдений, которые могут трактоваться как дедифференцировка или трансдифференцировка более резистентных и более зрелых потомков резидентных СК. Этим механизмом может объясняться увеличение числа СК с увеличением дозы облучения, когда все “истинные” СК стерилизуются [6]. Полипоз при мутациях генов *APC/бета-катенин* (*APC* - adenomatosis polyposis coli) сопровождается появлением клеток с фенотипом ранних предшественников энтероцитов в верхней части крипт, где в норме находятся лишь дифференцированные потомки [54]. Эктопический неогенез крипт (“расщепление” крипт) в кишечной слизи, предшествующий полипозу и обусловленный нарушениями в сигнальной цепи *Nhip/BMP4/Noggin*, вероятно, тоже связан с дедифференцировкой энтероцитов [14]. Можно упомянуть, что с репрограммированием коммитированных предшественников меланоцитов, весьма обоснованно связывают появление меланом [91].

Вероятно, в регенерации кишечника могут участвовать ранние предшественники гемопоэза из донорского костного мозга (КМ), которые встраиваясь в эпителий крипт (уровень переходного амплифицирующего пула – ТА), дифференцируются в направлении секреторных линий эпителиоцитов [92]. Оригинальная популяция клеток с фенотипом $CD45(-)Sca-1(+)$ c-kit(-) и обладающих стволовой активностью была обнаружена в костном мозге, скелетных мышцах и в эпителии тонкого кишечника, однако их способность к дифференцировке в соответствующие линии эпителиоцитов не была ещё исследована [93]. Все более утверждается мнение о том, что М-клетки, минорный компонент кишечного эпителия, трансдифференцируются из энтероцитов [94, 95]. Следует также отметить, что по-крайней мере *in vitro*, такой феномен наблюдался. А именно, методом экспрессии определенного сочетания транскрипционных факторов (*Ngn3*, *Pdx1*, *Mafa*) была проведена трансдифференцировка одних соматических клеток в другие, а именно: зрелых панкреатических экзокринных клеток в β -клетки [96].

В пользу гипотезы о том, что регенеративные процессы в поврежденной ткани, в частности кишечного эпителия, могут обеспечивать не только

резидентные СК, но и, например, их близкие потомки, приобретающие стволовые свойства в результате репрограммирования, могут быть интерпретированы недавно полученные новые данные. 1) В течение нескольких последних лет было открыто, что индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC, induced pluripotent stem cells) в отличие от эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) можно получить не только переносом соматического ядра в ооцит или слиянием соматической клетки с ЭСК, но и с помощью экспрессии в соматических клетках мышей и человека 4-х транскрипционных факторов (Okt3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) [97-99] или даже воздействием протеинов, кодируемых этими генами (piPSC, protein induced pluripotent stem cells). Однако в процессах самообновления и регенерации крипт пока почти не исследована роль этих критических для репрограммирования транскрипционных факторов. Любопытно, что фракция кишечного эпителия мыши, обогащенная клетками крипт, более эффективно репрограммировалась в iPSC, по сравнению с фракцией, содержащей клетки ворсинок [100]. 2) Следует учитывать также, что Wnt-сигнальная сеть, играющая существенную роль в развитии и гомеостазе кишечного эпителия [31, 54], является мощным промотором репрограммирования соматических клеток в плюрипотентные. В отсутствие c-Myc, обработка фибробластов кондиционной средой, содержащей Wnt3a – лиганд, активирующий Wnt/ β -catenin сигнальную сеть, существенно увеличивала эффективность репрограммирования [101]. Возможно, что и непептидные агенты способны поддерживать плюрипотентное состояние клеток через активацию Wnt-сети [102]. 3) Показано также, что феномен репрограммирования можно регулировать с помощью низкомолекулярных модуляторов эпигенетических процессов и кальциевых потоков [103-105], что представляет интерес для применения этих веществ к активации регенеративных процессов в эпителии кишечника. Следует отметить, что один из потенциальных маркеров СК кишечного эпителия – Bmi1 (таблица) также входит в состав факторов системы эпигенетической регуляции в iPSC [67]. 4) Кроме того, было обнаружено, что феномен эпителиально-мезенхимального перехода, часто активируемого во время инвазии и метастазирования злокачественных новообразований, может также сопровождаться возникновением клеток со стволовыми свойствами [106].

Приведённые выше данные обосновывают весьма актуальное направление поиска таких маркеров, которые будут специфическими для эпителиоцитов, способных к репрограммированию в СК эпителия кишечника после повреждающего воздействия. К ним, вероятно, относятся Msi1 и Prom1, характерные и для клеток СВС и для клеток из ТА популяции. Вероятными факторами, стимулирующими к репрограммированию, могут быть, в частности, индукция DDR (DNA damage response [65]) и/или агенты, выделяемые погибающими резидентными СК [107-108]. Регистрация и изоляция таких потенциальных СК может быть основой для развития новых подходов к увеличению эффективности клеточной терапии и регенеративной медицины [109-111].

При разработке новых средств противоопухолевой терапии следует учитывать, что различные субпопуляции СК крипты, а возможно и разных отделов пищеварительного тракта, будут отличаться по чувствительности (и механизмам) к факторам, инициирующим канцерогенез, прогрессию и метастазирование неоплазии [112]. Кроме того, накапливающиеся факты указывают на то, что инициация, прогрессия и метастазирование новообразований могут происходить не только согласно классической схеме последовательного накопления молекулярных событий, приводящих к трансформации СК нормальных тканей в неопластические СК [113]. Перспективным направлением поиска воздействий на инициацию репрограммирования ближних или дальних потомков нормальных СК в опухолевые может быть отбор препаратов, модифицирующих генетические и эпигенетические реакции СК и их микроокружение на генотоксические и стрессовые воздействия [114 -116].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Casali A., Batlle E.* (2009) *Cell Stem Cell*, **4**, 124–127.
2. *Xie T.* (2009) *Cell Stem Cell*, **5**, 227–228.
3. *Withers H.R., Elkind M.M.* (1968) *Radiology*, **91**, 998–1000.
4. *Withers H.R., Elkind M.M.* (1970) *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, **17**, 261–267.
5. *Крстич Р.В.* (2010) Атлас микроскопической анатомии человека (пер. с англ.), под ред. Р.П. Самусева. М.: ООО “Издательство Оникс”: ООО “Издательство “Мир и Образование””. сс. 208–227.
6. *Potten C.S.* (2004) *Radiat. Res.*, **161**, 123–136.
7. *Bjerknes M., Cheng H., Bjerknes M., Cheng H.* (1981) *Am. J. Anat.*, **160**, 105–112.
8. *Cheng H., Leblond C.P.* (1974) *Am. J. Anat.*, **141**, 537–561.
9. *Lorenzsonn V., Trier J.S.* (1968) *Gastroenterology*, **55**, 88–101.
10. *Yen T.H., Wright N.A.* (2006) *Stem Cell Rev.*, **2**, 203–212.
11. *Barker N., van de Wetering M., Clevers H.* (2008) *Genes. Dev.*, **22**, 1856–1864.
12. *Bjerknes M., Cheng H.* (2006) *Methods Enzymol.*, **419**, 337–383.
13. *Potten C. S., Ellis J. R.* (2006). *Ernst Schering Res. Found. Workshop*, **60**, 81–98.
14. *Bjerknes M., Cheng H.* (2005) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **289**, G381–G387.
15. *Booth C., Potten C.S.* (2000) *J. Clin. Invest.*, **105**, 1493–1499.
16. *Potten C.S., Owen G., Booth D.* (2002). *J. Cell. Sci.*, **115**, 2381–2388.
17. *Szotek P.P., Chang H.L., Brennand K., Fujino A., Pieretti–Vanmarcke R., Lo Celso C., Dombkowski D., Preffer F., Cohen K.S., Teixeira J., Donahoe P.K.* (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **105**, 12469–12473.
18. *Zhang H.B., Ren C.P., Yang X.Y., Wang L., Li H., Zhao M., Yang H., Yao K.T.* (2007) *Histochem. Cell. Biol.*, **127**, 347–354.
19. *Kiel M.J., He S., Ashkenazi R., Gentry S.N., Teta M., Kushner J.A., Jackson T.L., Morrison S.J.* (2007) *Nature*, **449**, 238–242.
20. *Walters K.* (2009) *Cell Prolif.*, **42**, 339–347.
21. *Kim S.J., Cheung S., Hellerstein M.K.* (2004) *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **286**, C1464–C1473.
22. *Wilson A., Oser G.M., Jaworski M., Blanco–Bose W.E., Laurenti E., Adolphe C., Essers M.A., Macdonald H.R., Trumpp A.* (2007) *Ann. N-Y Acad. Sci.*, **1106**, 64–75.
23. *Gutierrez–Gonzalez L., Deheragoda M., Elia G., Leedham S.J., Shankar A., Imber C., Jankowski J.A., Turnbull D.M., Novelli M., Wright N.A., McDonald S.A.* (2009) *J. Pathol.*, **217**, 489–496.
24. *Demidov O.N., Timofeev O., Lwin H.N., Kek C., Appella E., Bulavin D.V.* (2007) *Cell Stem Cell*, **1**, 180–190.
25. *Montgomery R.K., Breault D.T.* (2008) *J. Anat.*, **213**, 52–58.
26. *Gulati A.S., Ochsner S.A., Henning S.J.* (2008) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **294**, G286–G294.
27. *He X.C., Zhang J., Li L.* (2005). *Ann. N-Y Acad. Sci.*, **1049**, 28–38.
28. *Sancho E., Batlle E., Clevers H.* (2004) *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **20**, 695–723.
29. *Scoville D.H., Sato T., He X.C., Li L.* (2008) *Gastroenterology*, **134**, 849–864.
30. *Stappenbeck T.S., Mills J.C., Gordon J.I.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 1004–1009.
31. *Fevr T., Robine S., Louvard D., Huelsken J.* (2007) *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 7551–7559.
32. *Haegerbarth A., Clevers H.* (2009) *Am. J. Pathol.*, **174**, 715–721.
33. *Miyabayashi T., Teo J.L., Yamamoto M., McMillan M., Nguyen C., Kahn M.* (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 5668–5673.
34. *Van der Flier L. G., Sabates–Bellver J., Oving I., Haegerbarth A., De Palo M., Anti M., Van Gijn M., Suijkerbuijk S., Van de Wetering M., Marra G., Clevers H.* (2007) *Gastroenterology*, **132**, 628–632.

35. He X.C., Zhang J., Tong W.G., Tawfik O., Ross J., Scoville D.H., Tian Q., Zeng X., He X., Wiedemann L.M., Mishina Y., Li L. (2004) *Nat. Genet.*, **36**, 1117–1121.
36. He X.C., Yin T., Grindley J.C., Tian Q., Sato T., Tao W.A., Dirisina R., Porter–Westpfahl K. S., Hembree M., Johnson T., Wiedemann L.M., Barrett T.A., Hood L., Wu H., Li L. (2007) *Nat. Genet.*, **39**, 189–198.
37. Bjerknes M., Cheng H. (2005) *Nat. Genet.*, **37**, 1016–1071.
38. Batlle E., Henderson J.T., Beghtel H., van den Born M.M., Sancho E., Huls G., Meeldijk J., Robertson J., van de Wetering M., Pawson T., Clevers H. (2002) *Cell*, **111**, 251–263.
39. Giannakis M., Stappenbeck T.S., Mills J.C., Leip D.G., Lovett M., Clifton S.W., Ippolito J.E., Glasscock J.I., Arumugam M., Brent M.R., Gordon J.I. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 11292–11300.
40. Beaulieu J.F. (1992) *J. Cell. Sci.*, **102**, 427–436.
41. Fujimoto K., Beauchamp R.D., Whitehead R.H. (2002) *Gastroenterology*, **123**, 1941–1948.
42. May R., Riehl T.E., Hunt C., Sureban S.M., Anant S., Houchen C.W. (2008) *Stem Cells*, **26**, 630–637.
43. Kayahara T., Sawada M., Takaishi S., Fukui H., Seno H., Fukuzawa H., Suzuki K., Hiai H., Kageyama R., Okano H., Chiba T. (2003) *FEBS Lett.*, **535**, 131–135.
44. Yu T., Chen Q.K., Gong Y., Xia Z.S., Royal C.R., Huang K.H. (2010) *Med. Sci. Monit.*, **16**, BR68–74.
45. Murayama M., Okamoto R., Tsuchiya K., Akiyama J., Nakamura T., Sakamoto N., Kanai T., Watanabe M. (2009) *J. Gastroenterol.*, **44**, 173–182.
46. Bach S.P., Renehan A.G., Potten C.S. (2000) *Carcinogenesis*, **21**, 469–476.
47. Breault D.T., Min I.M., Carlone D.L., Farilla L.G., Ambruzs D.M., Henderson D.E., Algra S., Montgomery R.K., Wagers A.J., Hole N. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 10420–10425.
48. Martin K., Kirkwood T.B., Potten C.S. (1998) *Exp. Cell. Res.*, **241**, 316–323.
49. Forsyth N.R., Wright W.E., Shay J.W. (2002) *Differentiation*, **69**, 188–197.
50. Hemann M.T., Greider C.W. (2000) *Nucleic Acids Res.*, **28**, 4474–4478.
51. Kipling D., Cooke H.J. (1990) *Nature*, **347**, 400–402.
52. Barker N., van Es J.H., Jaks V., Kasper M., Snippert H., Toftgård R., Clevers H. (2008) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, **73**, 351–356.
53. Carlone D.L. (2009) *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.*, Chapter 5:Unit 5A.2.
54. van de Wetering M., Sancho E., Verweij C., de Lau W., Oving I., Hurlstone A., van der Horn K., Batlle E., Coudreuse D., Haramis A.P., Tjon–Pon–Fong M., Moerer P., van den Born M., Soete G., Pals S., Eilers M., Medema R., Clevers H. (2002) *Cell*, **111**, 241–250.
55. Hsu S.Y., Liang S.G., Hsueh A J. (1998) *Mol. Endocrinol.*, **12**, 1830–1845.
56. Ishikawa F., Yasukawa M., Yoshida S., Nakamura K., Nagatoshi Y., Kanemaru T., Shimoda K., Shimoda S., Miyamoto T., Okamura J., Shultz L.D., Harada M. (2004) *FASEB J.*, **18**, 1958–1960.
57. Lynch L., O'Donoghue D., Dean J., O'Sullivan J., O'Farrelly C., Golden–Mason L. (2006) *J. Immunol.*, **176**, 5199–204.
58. Barker N., van Es J.H., Kuipers J., Kujala P., van den Born M., Cozijnsen M., Haegerbarth A., Korving J., Begthel H., Peters P.J., Clevers H. (2007) *Nature*, **449**, 1003–1007.
59. Becker L., Huang Q., Mashimo H. (2008) *Scientific World J.*, **8**, 1168–1176.
60. Snippert H.J., van Es J.H., van den Born M., Begthel H., Stange D.E., Barker N., Clevers H. (2009) *Gastroenterol.*, **136**, 2187–2194.
61. van der Flier L.G., van Gijn M.E., Hatzis P., Kujala P., Haegerbarth A., Stange D.E., Begthel H., van den Born M., Gurjev V., Oving I., van Es J.H., Barker N., Peters P.J., van de Wetering M., Clevers H. (2009) *Cell*, **136**, 903–912.
62. van der Flier L.G., Haegerbarth A., Stange D.E., van de Wetering M., Clevers H. (2009) *Gastroenterol.*, **137**, 15–17.

63. Sato T., Vries R.G., Snippert H.J., van de Wetering M., Barker N., Stange D.E., van Es J.H., Abo A., Kujala P., Peters P.J., Clevers H. (2009) *Nature*, **459**, 262–265.
64. Gracz A.D., Ramalingam S., Magness S.T. (2010) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2010 Feb 25. [Epub ahead of print].
65. Bao S., Wu Q., McLendon R.E., Hao Y., Shi Q., Hjelmeland A.B., Dewhirst M.W., Bigner D.D., Rich J.N. (2006) *Nature*, **444**, 756–760.
66. Zhu L., Gibson P., Currle D.S., Tong Y., Richardson R.J., Bayazitov I.T., Poppleton H., Zakharenko S., Ellison D.W., Gilbertson R.J. (2009) *Nature*, **457**, 603–607.
67. Ng R.K., Gordon J.B. (2008) *Cell Cycle*, **7**, 1173–1177.
68. Sangiorgi E., Capecchi M.R. (2008) *Nat. Genet.*, **40**, 915–920.
69. Sangiorgi E., Capecchi M.R. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 7101–7106.
70. Moore K.A., Lemischka I.R. (2006) *Science*, **311**, 1880–1885.
71. Simon-Assmann P., Turck N., Sidhoum-Jenny M., Gradwohl G., Kedinger M. (2007) *Cell. Biol. Toxicol.*, **23**, 241–256.
72. Barker N., Huch M., Kujala P., van de Wetering M., Snippert H.J., van Es J.H., Sato T., Stange D.E., Begthel H., van den Born M., Danenberg E., van den Brink S., Korving J., Abo A., Peters P.J., Wright N., Poulsom R., Clevers H. (2010) *Cell Stem Cell*, **6**, 25–36.
73. Kondo M., Wagers A. J., Manz M.G., Prohaska S.S., Scherer D.C., Beilhack G.F., Shizuru J.A., Weissman I.L. (2003) *Annu. Rev. Immunol.*, **21**, 759–806.
74. Alison M.R., Islam S. (2009) *J. Pathol.*, **217**, 144–160.
75. Alison M.R., Poulsom R., Brittan M., Schier S., Burkert J., Wright N.A. (2006) *Gastroenterology*, **130**, 1012–1013.
76. Dekaney C.M., Rodriguez J.M., Graul M.C., Henning S.J. (2005) *Gastroenterology*, **129**, 1567–1580.
77. Samuel S., Walsh R., Webb J., Robins A., Potten C., Mahida Y.R. (2009) *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **296**, C296–C305.
78. Zuba-Surma E.K., Kucia M., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. (2009) *Cytometry A*, **75**, 4–13.
79. Jones R.J., Barber J.P., Vala M.S., Collector M.I., Kaufmann S.H., Ludeman S.M., Colvin O.M., Hilton J. (1995) *Blood*, **85**, 2742–2746.
80. Huang E.H., Hynes M.J., Zhang T., Ginestier C., Dontu G., Appelman H., Fields J.Z., Wicha M.S., Boman B.M. (2009) *Cancer Res.*, **69**, 3382–3389.
81. Chu P., Clanton D.J., Snipas T.S., Lee J., Mitchell E., Nguyen M.L., Hare E., Peach R.J. (2009) *Int. J. Cancer*, **124**, 1312–1321.
82. Gordon G.J., Coleman W.B., Hixson D.C., Grisham J.W. (2000) *Am. J. Pathol.*, **156**, 607–619.
83. Amcheslavsky A., Jiang J., Ip Y.T. (2009) *Cell Stem Cell*, **4**, 49–61.
84. Lee G., White L.S., Hurov K.E., Stappenbeck T.S., Piwnica-Worms H. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 4701–4706.
85. Garrison A.P., Dekaney C.M., von Allmen D.C., Lund P.K., Henning S.J., Helmrath M.A. (2009) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **296**, G643–G650.
86. Helmrath M.A., Fong J.J., Dekaney C.M., Henning S.J. (2007) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **292**, G215–G222.
87. Chatterjee M., Ip Y.T. (2009) *J. Cell. Physiol.*, **220**, 664–671.
88. Fox D.T., Spradling A.C. (2009) *Cell Stem Cell*, **5**, 290–297.
89. Takashima S., Mkrtchyan M., Younossi-Hartenstein A., Merriam J.R., Hartenstein V. (2008) *Nature*, **454**, 651–655.
90. Zipori D. (2005) *Stem Cells*, **23**, 719–726.
91. Zabierowski S.E., Herlyn M. (2008) *J. Clin. Oncol.*, **26**, 2890–2894.
92. Okamoto R., Matsumoto T., Watanabe M. (2006). *Human Cell*, **19**, 71–75.
93. Howell J.C., Lee W.H., Morrison P., Zhong J., Yoder M.C., Srour E.F. (2003) *Ann. N-Y Acad. Sci.*, **996**, 158–173.

94. Kerneis S., Pringault E. (1999) *Semin. Immunol.*, **11**, 205–215.
95. Corr S.C., Gahan C.C., Hill C. (2008) *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **52**, 2–12.
96. Zhou Q., Brown J., Kanarek A., Rajagopal J., Melton D.A. (2008) *Nature*, **455**, 627–632.
97. Kaji K., Norrby K., Paca A., Mileikovsky M., Mohseni P., Woltjen K. (2009) *Nature*, **458**, 771–775.
98. Takahashi K., Yamanaka S. (2006) *Cell*, **126**, 663–676.
99. Yu J., Vodyanik M.A., Smuga–Otto K., Antosiewicz–Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I.I., Thomson J.A. (2007) *Science*, **318**, 1917–1920.
100. Wernig M., Lengner C.J., Hanna J., Lodato M.A., Steine E., Foreman R., Staerk J., Markoulaki S., Jaenisch R.A. (2008) *Nat. Biotechnol.*, **26**, 916–924.
101. Marson A., Foreman R., Chevalier B., Bilodeau S., Kahn M., Young R.A., Jaenisch R. (2008) *Cell Stem Cell*, **3**, 132–135.
102. Sato N., Meijer L., Skaltsounis L., Greengard P., Brivanlou A.H. (2004) *Nat. Med.*, **10**, 55–63.
103. Huangfu D., Osafune K., Maehr R., Guo W., Eijkelenboom A., Chen S., Muhlestein W., Melton D.A. (2008) *Nat. Biotechnol.*, **26**, 1269–1275.
104. Mikkelsen T.S., Hanna J., Zhang X., Ku M., Wernig M., Schorderet P., Bernstein B.E., Jaenisch R., Lander E.S., Meissner A. (2008) *Nature*, **454**, 49–55.
105. Shi Y., Despons C., Do J.T., Hahm H.S., Schöler H.R., Ding S. (2008) *Cell Stem Cell*, **3**, 568–574.
106. Mani S.A., Guo W., Liao M.J., Eaton E.N., Ayyanan A., Zhou A.Y., Brooks M., Reinhard F., Zhang C.C., Shipitsin M., Campbell L.L., Polyak K., Briskin C., Yang J., Weinberg R.A. (2008) *Cell*, **133**, 704–715.
107. Проскуряков С.И., Габай В.Л., Коноплянников А.Г., Замулаева И.А., Колесникова А.И. (2005) *Биохимия (М.)*, **70**, 1310–1320.
108. Krysko D.V., Vandenabeele P.F. (2008) *Cell Death. Differ.*, **15**, 29–38.
109. Piscaglia A.C., Novi M., Campanale M., Gasbarrini A. (2008) *Minim. Invasive Ther. Allied Technol.*, **17**, 100–118.
110. Sala F.G., Kunisaki S.M., Ochoa E.R., Vacanti J., Grikscheit T.C. (2009) *J. Surg. Res.*, **156**, 205–212.
111. Ведин Л.А., Сенников С.В., Труфакин В.А., Козлов В.А. (2007) *Бюлл. эксп. биол. мед.*, **143**, 524–527.
112. Li L., Clevers H. (2010) *Science*, **327**, 542–545.
113. Barker N., Ridgway R.A., van Es J.H., van de Wetering M., Begthel H., van den Born M., Danenberg E., Clarke A.R., Sansom O.J., Clevers H. (2009) *Nature*, **457**, 608–611.
114. Kirsch D.G., Santiago P.M., di Tomaso E., Sullivan J.M., Hou W.S., Dayton T., Jeffords L.B., Sodha P., Mercer K.L., Cohen R., Takeuchi O., Korsmeyer S.J., Bronson R.T., Kim C.F., Haigis K.M., Jain R.K., Jacks T. (2010) *Science*, **327**, 593–596.
115. Walker M.R., Stappenbeck T.S. (2008) *Curr. Opin. Gastroenterol.*, **24**, 115–120.
116. Проскуряков С.Я., Коноплянников А.Г., Ульянова Л.П., Логунов Д.Ю., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. (2009) *Биомед. химия*, **55**, 587–609.

Поступила: 14. 09. 2009.

WHERE INTESTINAL EPITHELIAL STEM CELLS ARE LOCALIZED?
ABOUT MOLECULAR MARKERS

S.Ya. Proskuryakov, A.G. Konoplyannikov, Yu.G. Verkhovskii, L.P. Ulyanova, A.F. Tsyb

Medical Radiological Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Koroleva 4, Obninsk,
249036 Russia; tel./fax: +7(48439)7-44-96, +7 (48439)7-48-63, +7(495)956-14-40;
e-mail: pros@mrrc.obninsk.ru

Using stem cells as an example the review considers a new history and methodology of search for stem cells (SC), found in tissues of adult *Homo sapiens* and *Drosophila melanogaster* organisms. These studies of SC resulted in several original hypotheses explaining their unusual features. Impressive progress recently achieved in this direction (2008-2010) is associated with employment of new methods of somatic recombination for long-term registration of various strains of differentiated cells, early and distant SC progeny. 1) Although anatomic localization of intestinal epithelium cells lacking marked morphological and biochemical differentiation markers (the lower third of intestinal and colon crypts) is known for about 40 years results of their experimental identification, isolation and detection of their functional characteristics still represent the subject for discussions. Particularly, it remains unclear, which SC are involved in crypt regeneration: the same as those involved into homeostatic renewal or their various subpopulations or early SC progenies acquired stem features by reprogramming? 2) In addition, most detected biochemical markers of potential SC are common for SC from other tissues of embryonic and mature organisms so it is possible to apply method developed for intestinal epithelium for their isolation. 3) Data on induction of intestinal epithelium polyps and neoplasias by mutations in genes encoding SC markers and identification of biochemical characteristics of potential SC in these tumors support the hypothesis of stem tumor cell origination from normal SC or their earliest progeny. In general, facts considered in this review may be useful for both development of optimal methods for the use of SC in cell therapy (as the source of humoral factors), regenerative medicine (as the source of differentiated cells for restoration of injured tissue), and also for targeted search of antitumor drugs (SC as the target) and preparations modifying genetic and epigenetic reactions of SC to genotoxic and stress treatments.

Key words: stem cells, intestinal epithelium, markers.