

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)

АГЛЯДЫ
REVIEWS

УДК 577.3
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-1-106-118>

Поступила в редакцию 16.10.2019
Received 16.10.2019

И. Д. Волотовский, Д. А. Ермоленко, Н. И. Горохова

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

**ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК.
ДИФФЕРЕНЦИРОВКА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ПЕЧЕНИ**

Аннотация. В обзоре приведены последние данные по эпигенетическому контролю дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток, лежащего в основе эмбриогенеза и регенеративных процессов в организме. Эпигенетический контроль базируется на трех внутримолекулярных механизмах – метилировании ДНК, структурной модификации белков гистонов и действии микроРНК на посттранскрипционных и посттрансляционных уровнях. В качестве примера рассмотрены вопросы дифференцировки стволовых клеток в печени.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, дифференцировка, эпигенетика, метилирование ДНК, структурная модификация гистонов, микроРНК, стволовые клетки печени

Для цитирования: Волотовский, И. Д. Эпигенетический контроль дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток. Дифференцировка стволовых клеток в печени / И. Д. Волотовский, Д. А. Ермоленко, Н. И. Горохова // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2020. – Т. 65, № 1. – С. 106–118. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-1-106-118>

Igor D. Volotovskii, Darya A. Ermolenko, Nadezhda I. Harokhava

Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

**EPIGENETIC CONTROL OF DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS.
STEM CELLS DIFFERENTIATION IN LIVER**

Abstract. The recent data on epigenetic control of differentiation in mesenchymal stem cells to be the background of embryogenesis and regeneration process in organism are considered. Epigenetic control is based on three intramolecular mechanisms – DNA methylation, structural modification of histone proteins and microRNA active on posttranscription and posttranslation levels. As an example, the issues of stem cell differentiation in the liver are considered.

Keywords: mesenchymal stem cells, differentiation, epigenetics, DNA methylation, histone structural modification, microRNA, stem cells in liver

For citation: Volotovskii I. D., Ermolenko D. A., Harokhava N. I. Epigenetic control of differentiation of mesenchymal stem cells. Stem cells differentiation in liver. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2020, vol. 65, no. 1, pp. 106–118 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-1-106-118>

Введение. Дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток (МСК) является стартовым событием в образовании специализированных соматических клеток и формировании тканей и органов. Известно, что дифференцировка запускается продуктами экспрессии специфических генов, которая в преддифференцировочный период подавлена. Данные продукты индуцируют сложный комплекс внутриклеточных процессов, благодаря которым исходная МСК превращается в клетку, очень далекую от МСК не только фенотипически, но и структурно, а также морфологически и обладающую рядом новых параметров, хотя генотип обоих типов клеток (стволовых и специализированных) одинаков.

Следует отметить также одно очень важное обстоятельство: МСК в реальных условиях не являются суспензией клеток, статистически распределенных в тканях и органах, а, входя в состав так называемых ниш, находятся в окружении других клеток, кровеносных сосудов и нервных окончаний, которые вовлекают МСК в уникальные межклеточные взаимодействия. В их режиме МСК делятся, самообновляются и, самое главное, вступают на путь дифференцировки, завершающейся образованием зрелой, функционально активной специализированной клетки. В каждой ткани или органе имеются свои ниши. Их количество невелико, если учесть, что в зрелой ткани или органе на 1 млн специализированных клеток приходится одна МСК. Рассматривая нишу как многоклеточный специализированный компонент ткани, нужно учитывать еще один важный момент. Сама ниша и входящие в ее состав стволовые клетки находятся под влиянием разнообразных сигнальных стимулов, поступающих как изнутри организма (из тканей и органов), так и извне. Задача этих сигналов – держать МСК под жестким контролем, определяя их дальнейшую «судьбу». В целом, все многообразие сигналов проявляется включением и выключением экспрессии определенных генов в геноме клетки, которая реализуется в ее морфологическом или фенотипическом «портрете».

Мишени для сигналов имеют двоякую локализацию. Одни из них находятся в самих генах, и их структурная модификация ведет к изменениям на уровне генетического кода, т. е. к мутациям. Другие не связаны с генетическим контролем структурных участков генов и находятся вне структуры (экзонов и интронов) на уровне промоторных участков, структурных компонентов хромосом и, как принято считать, осуществляют эпигенетический контроль экспрессии генов. Примечательно, однако, что результаты и генетического, и эпигенетического контроля экспрессии генов наследуются.

Термин «эпигенетика» ввел в 1942 г. Конрад Уоддингтон для описания взаимодействия между генотипом и окружением, которые совместно определяют характеристические признаки организма, т. е. его фенотип. Существует множество определений эпигенетики, однако все они акцентируют внимание на одном важном моменте – изменение экспрессии гена происходит без изменения природы и последовательности нуклеиновых оснований ДНК.

Эпигенетический механизм контроля включает три группы экспрессии генов: а) метилирование ДНК; б) модификацию гистонов и хромосом через их метилирование и ацетилирование; в) некодирующие РНК, к которым относятся длинные некодирующие РНК (lncRNA), малые некодирующие РНК (snRNA), включающие микроРНК (miRNA) и малые интерферирующие РНК (siRNA). Некоторые исследователи к эпигенетическим факторам контроля относят транскрипционные факторы и прионы [1]. Эпигенетические механизмы функционируют по типу включателя/выключателя [2]. Однако способность клетки к развитию, коммитированию стволовости/направленности дальнейшей дифференцировки, т. е. глубина структурно-функциональных перестроек напрямую зависит от активности специализированных генов, ответственных за направленность процессов. Наглядным примером этого является нейрогенная дифференцировка МСК, которая контролируется двумя генами: *H3K27ac* и *H3Kme3*.

Итак, эпигенетика – это набор наследуемых изменений, контролирующих экспрессию без изменения природы и чередования нуклеиновых оснований в ДНК через структурно-функциональную модификацию экспрессии с помощью метилирования ДНК в промоторных участках генов, перестроек на уровне хроматина и его ремоделирования и микроРНК, вмешивающихся в процесс экспрессии генов на уровне созревания мРНК [1]. Все это модифицирует пространственную архитектуру структурных компонентов.

Мезенхимальные стволовые клетки. МСК относят к популяции взрослых стволовых клеток, которые благодаря своему многообещающему потенциалу являются наиболее широко изучаемым объектом клеточной биологии в настоящее время. Находясь в депонированном состоянии в нишах тканей и органов, они могут пролиферировать и дифференцироваться по крайней мере по трем каноническим направлениям: остео-, хондро- и адипоцитогенному. В организме имеется несколько клеточных депо, в которых количество МСК относительно велико. Это жировая ткань, костный мозг и ткань пуповинного канатика. Тем не менее во всех органах и в других тканях они представлены в исчезающе малых количествах.

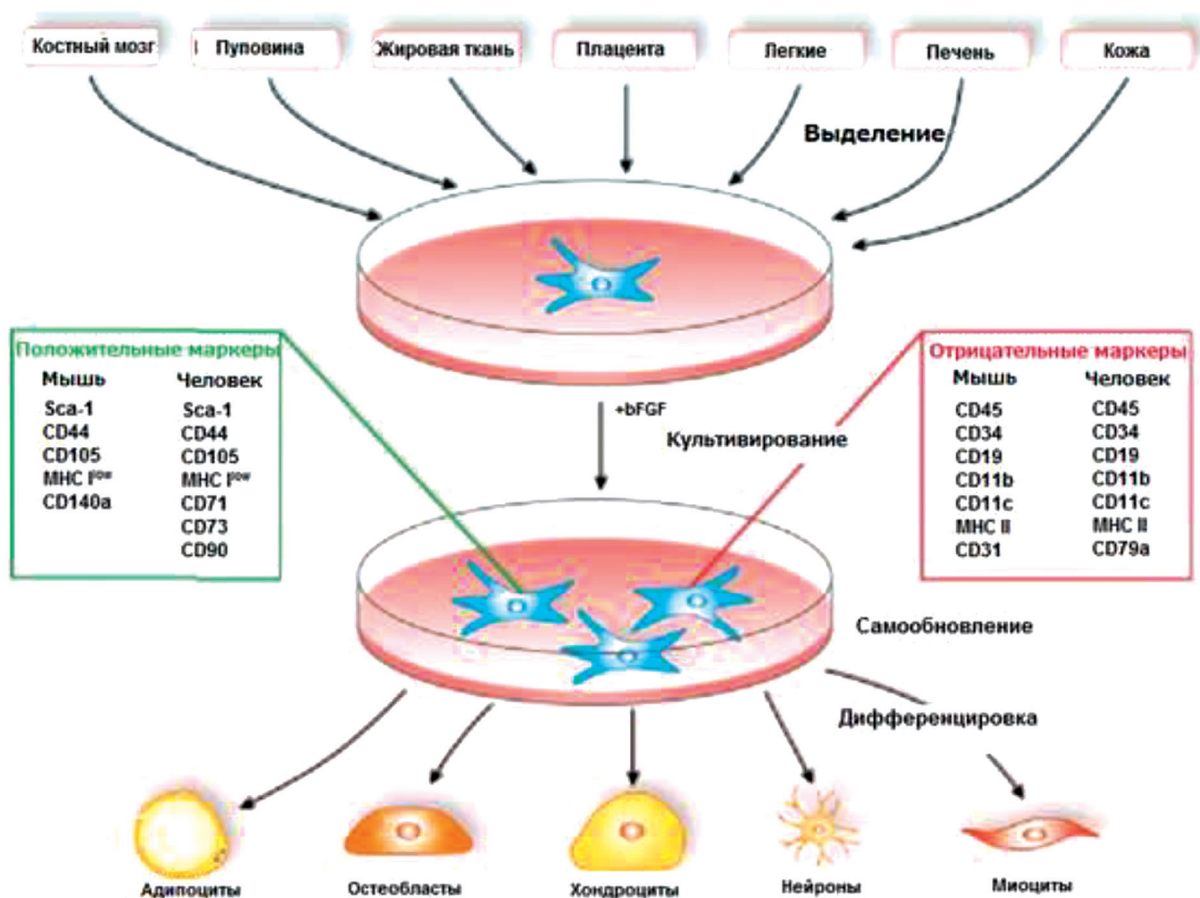


Рис. 1. Схема, описывающая процесс культивирования биологических источников МСК и пути дифференцировки этих клеток [4]. В рамках приведены позитивные и негативные маркерные белки, используемые для фенотипической характеристики стволовых клеток

Fig. 1. Diagram describing the process of culturing biological sources of MSCs and ways of differentiation of these cells [4]. The framework provides positive and negative marker proteins used for phenotypic characterization of stem cells

Согласно критериям Международной ассоциации клеточной терапии (ISCT), к МСК относят: а) выделенные из клеточных депо и очищенные клетки, которые адгезируют к пластику; б) клетки, обнаруживающие позитивную реакцию к маркерным моноклональным антителам CD105, CD90, CD73, слабую позитивную реакцию к МНС-1 и негативную реакцию к МНС2, CD11, CD14, CD34, Cd45, CD31; в) клетки, дифференцирующиеся по трем указанным выше направлениям [3]. Изолированные МСК, согласно критериям ISCT, представляют собой гетерогенную неклоновую культуру стромальных клеток с различными мультипотентными свойствами, коммитированных прогениторных и дифференцированных клеток (рис. 1). При культивировании МСК чистота в ходе пассажей культуры растет. На практике при получении МСК ограничиваются двумя-тремя пассажами.

Метилирование ДНК. Метилирование ДНК – ключевой процесс эмбриогенеза и нормального развития и наиболее широко изучаемый вариант эпигенетического контроля. Показано, что с метилированием ДНК сопряжена экспрессия генов, инактивация X-хромосомы, геномный импринтинг, поддержание структуры хроматина, «замалчивание» транспозонов, укорочение длины теломеров. Биохимически метилирование ДНК заключается в присоединении метильной группы к цитозину в С5 положении, реакция катализируется консервативной метилтрансферазой, DNMT1 и тремя метилтрансферазами, образованными *de novo*: DNMT3a, DNMT3b, DNMT3c. Донором метильной группы ($-\text{CH}_3$) является S-аденозинметионин. В результате образуется 5-метилцитозин. Обратное деметилирование (5mC) происходит через несколько последовательных реакций: сначала 5mC окисляется деоксигеназой (TET) в 5-гидроксиметилцитозин (5hmC), после чего окисляется до карбиксиметилцитозина (cahmC) и формилметилцитозина (fahmC), а затем превращается в 5mC (рис. 2).

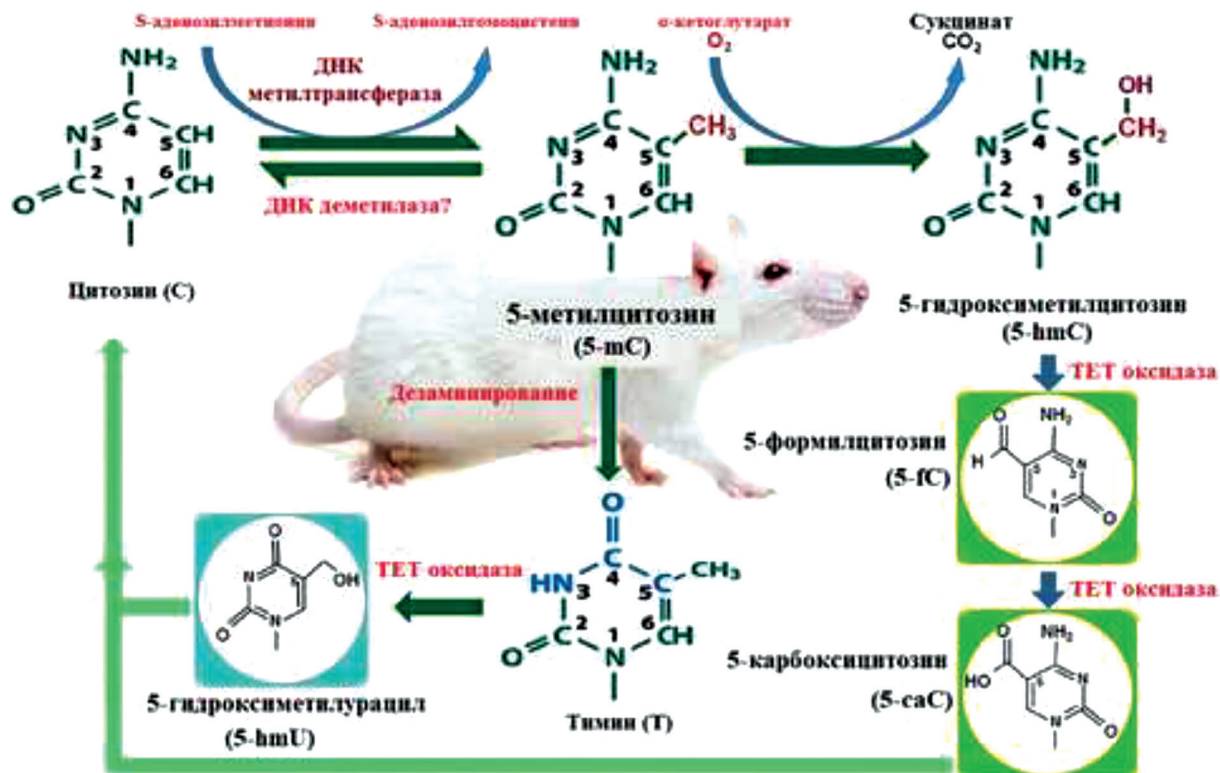


Рис. 2. Последовательность биохимических реакций, лежащих в основе метилирования ДНК [6]

Fig. 2. The sequence of biochemical reactions underlying DNA methylation [6]

Преимущественно метилируются остатки цитозина в составе так называемых цитозин-гуаниновых (CpG) островков в промоторных участках генов, что приводит к подавлению их транскрипции. Из указанных выше трансфераз именно DNMT3a ответственна за катализ метилирования цитозина в C5 положении [5].

Последовательности ДНК, богатые CpG-островками, обнаружены в областях промоторов или вблизи них. У многих генов человека метилирование указанных участков обуславливает репрессию этих генов. Однако эта связь не всегда простая. Гены, у которых CpG-островки деметилированы, часто не экспрессируются, в то время как гены с метилированными промоторами транскрибируются [7]. Постулируются два механизма контроля экспрессии генов через метилирование ДНК: а) метилирование ДНК не дает транскрипционным факторам связываться с геномом, т. е. блокирует транскрипцию; б) метилированные CpG динуклеотиды распознаются белками, содержащими метил-CpG связывающие домены (MBD), такими как белок MBD1 и MvCP2, которые активно блокируют эти сайты, что приводит к подавлению экспрессии генов [5, 8]. MBD-белки или сами блокируют транскрипцию, или действуют в кооперации с ферментами, ответственными за модификацию гистонов.

Традиционно метилирование ДНК рассматривается как стабильная, необратимая эпигенетическая модификация. Однако это не так. Цитозин может деметилироваться по активному и пассивному вариантам. Активное деметилирование осуществляется ферментом TET1 – tet-метилцитозиноксидазой, катализирующей превращение 5-метилцитозина в 5-гидрометилцитозин [9], а пассивный процесс реализуется через подавление активности фермента DNMT1. Большое количество данных было получено при изучении особенностей метилирования ДНК при развитии нервной системы у экспериментальных животных [6], что позволило лучше понять механизм эпигенетического контроля при дифференцировке стволовых клеток [7].

Модификация гистонов. В основе модификации гистонов находятся реакции посттрансляционной модификации (ацетилирование, метилирование, убиквитинирование, сумолирование, фосфорилирование N-терминальных концов гистонов), приводящие к АДФ-рибозилированию, деими-

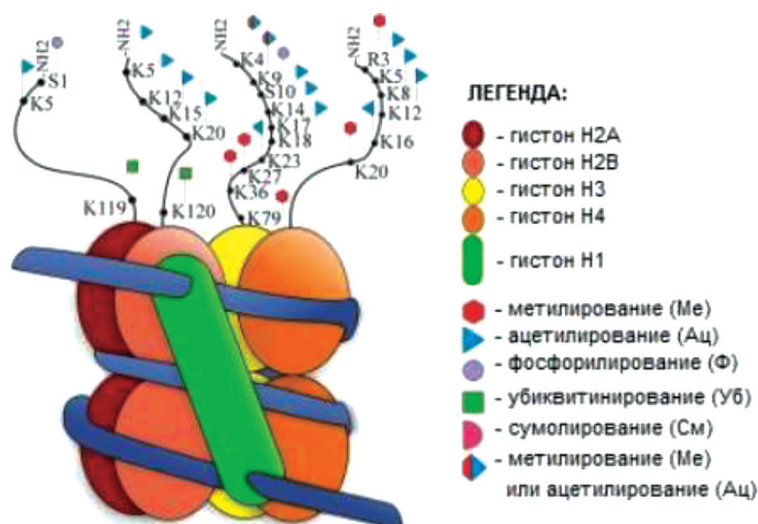
нированию, изомеризации пролина, протонированию, цитрулинированию [10]. Как видно, набор ферментов, атакующих гистоны в составе нуклеосомы, очень широк, поэтому нередко та или иная ферментативная модификация гистонов приводит как к положительным, так и к отрицательным эффектам. Например, ацетилирование остатков лизина гистоновой ацетилтрансферазой снижает напряженность ДНК-спиралей и способствует транскрипции, в то время как удаление ацильных групп гистоновой деацетилазой (HDAC) обуславливает «замалчивание» генов. В то же время метилирование остатков лизина и аргинина в гистонах может активировать или подавлять транскрипцию в зависимости от локализации мишеней метилирования в макромолекуле гистона [11].

Нуклеосомы – основная повторяющаяся единица структуры хроматина, построенная из ДНК и связанных с ней макромолекул гистоновых белков. Отрезок ДНК, состоящий из 146 нуклеиновых оснований (н. о.), свернут в левостороннюю альфа-спираль, которая обволакивает гистоновый октамер, состоящий из $(H3-H4)_2$ -тетрамера и $H2A-H2B$ димера. Нуклеосомы связаны между собой линкером – цепочкой ДНК, ассоциированной с гистонами Н1. Гистоны – небольшие щелочные белки, включающие С-терминальный домен и N-терминальный «хвост», – заряжены положительно и экспонированы наружу. «Хвост» богат лизиновыми и аргининовыми аминокислотными остатками и играет важную роль в стабилизации структуры нуклеосом и хроматина. Изменение на уровне структуры гистонов и хроматина нарушает доступность различных факторов к ДНК. Посттрансляционная модификация белковых компонентов базируется на их химической модификации, субъединичном составе, конформации отдельных нуклеосом и свернутом контуре мультинуклеосомного хроматинового «волокна» (бусы на нити).

В целом, система контролируется четырьмя регуляторными механизмами: а) действием АТФ-зависимых ферментов ремоделирования, изменяющих конформационное состояние нуклеосом и сдвигающих их в сторону от ДНК; б) влиянием структурно модифицированных вариантов гистонов, появление которых в нуклеосоме нарушает ее стабильность и взаимодействие с другими регуляторами хроматина; в) эффектом ковалентных модификаторов гистонов, которые меняют число аминокислотных остатков во всех гистоновых белках; г) действием таких белков стабилизации «архитектуры» хромосомы, как когезин и конденсин. В целом, посттрансляционная модификация белковых компонентов нуклеосом нарушает структурную организацию хроматина и тем самым регулирует разные процессы на уровне генетического аппарата, а именно: ДНК-репликацию и формирование хроматинового ансамбля после репликации, транскрипцию и ДНК-репарацию [12]. T. Jenuwein, O. D. Allis [13] сформулировали так называемую гипотезу гистонного кода, согласно которой различные комбинации модификаций гистонов могут приводить к разным результатам. Более того, их взаимодействие друг с другом может быть как синергическим, так и антагонистическим.

В посттрансляционной модификации гистонов участвует три типа ферментов. Первый тип – ферменты, катализирующие присоединение метильных, ацильных и других групп к гистоновым «хвостам» (например, PRC2, SUV39H, DOT1L, обладающие метилтрансферазной активностью). Второй тип – белки, которые специфически связываются с определенными сайтами в молекулах гистонов, после чего запускаются процессы их деградации (например, убиквитинизация). К третьему типу относятся ферменты деметилазы и деацетилазы, которые элиминируют результаты посттрансляционной модификации [14]. Около 580 регуляторов гистонов из 8 модельных организмов классифицированы по определенным семействам и включены в банк данных [15].

Ацетилирование гистонов связано с лизиновыми остатками в N-терминальных «хвостах» гистона N3 (4 остатка) и гистона N4 (4 остатка) (рис. 3). В этой ферментативной реакции донором ацильной группы является ацетилкоэнзим А, при этом изменяется заряд «хвоста» и уменьшается интенсивность электростатического взаимодействия между положительно заряженными молекулами гистонов и отрицательно заряженной цепочкой ДНК. Кроме того, ослабляется связывание гистонов N3 и N4 с линкером – гистонами Н1, который контролирует деконденсацию хроматина, а следовательно, и связывание транскрипционных факторов с ДНК. Другими словами, профили ацетилирования у эухроматина и гетерохроматина различны. Уровень ацетилирования гистонов – результат динамического процесса, определяемого ацетилтрансферазами (НАТ) и деацетилазами (HDAC). Идентифицированные у животных 8 ферментов типа HDAC разделены на четыре группы.



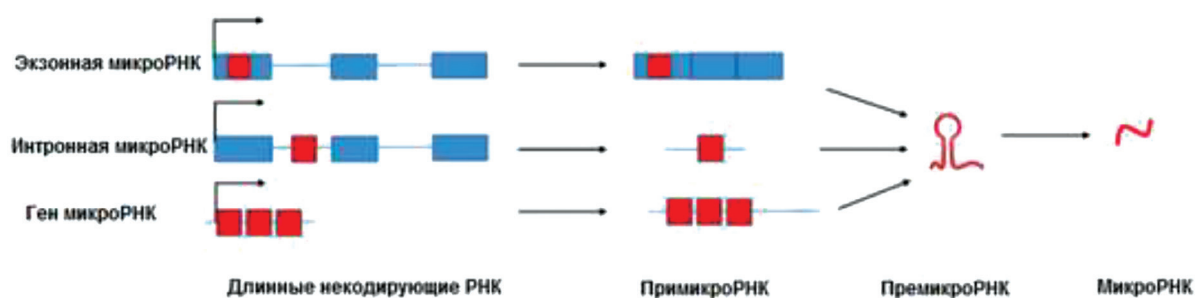


Рис. 4. Схема образования микроРНК в геноме [19]

Fig. 4. Scheme of microRNA formation in the genome [19]

действуя на ферменты DNMT и HDAC 1 и 4 через их мРНК. На рис. 4 приведен механизм образования микроРНК в клетке.

Многие гены длинные некодирующие РНК содержат в себе нуклеотидные последовательности микроРНК, которые могут находиться в составе экзонов или интронов. МикроРНК кодируются независимыми транскрипционными единицами, часто объединенными в геноме в кластеры [20]. В ходе транскрипции образуются три первичных транскрипта, однако все три пути конвергируют на уровне пре-микроРНК [19].

Совершенствование методов секвенирования геномов позволило обнаружить такой парадоксальный факт, что в геноме транскрибируется гораздо больше последовательностей, чем ожидалось. Выявлено необычайно большое количество некодирующих генов и, следовательно, транскриптов неопределенной функции [19], которые получили название темного материала (dark matter). Его значительной частью являются некодирующие РНК, которые не несут в себе информации о строении белков и никогда не транскрибируются. Выделяют две группы таких РНК: длинные и короткие некодирующие РНК. Короткие некодирующие РНК включают в себя микроРНК, малые интерферирующие РНК и PIWI-взаимодействующие РНК. При попытке дать общую характеристику этому виду генных продуктов сам собой напрашивается следующий гипотетический вывод: геном следует рассматривать не как линейную последовательность транскрипционных единиц, а как удивительно сложную мозаику переплетенных и перекрывающихся транскрибируемых последовательностей не только в противоположных цепочках ДНК, но и в одной и той же цепочке, причем зачастую нет четкого различия между состыкованными вариантами и перекрывающимися соседними генами.

Перейдем теперь к рассмотрению молекулярной регуляции дифференцировки МСК на примере их превращения в адипоциты и остеобласты внутри канонической триады дифференцировки. Дифференцировка МСК представляет собой двухстадийный процесс, который включает: а) коммитирование стволовых клеток в прогениторные клетки [20]; б) созревание прогениторных клеток в специализированные клетки [21].

В реализации первой стадии принимают участие несколько критических сигнальных механизмов, в основе которых – использование разнообразных биологически активных факторов: TGF β , морфогенетического сигнального белка костной ткани BMP, транскрипционных факторов Wnt, Hh, Notch, а кроме того, важная роль отводится и микроРНК. Следует напомнить, что МСК находятся в нишах и именно на их уровне формируется сложная сеть сигналов, запускающих или подавляющих дифференцировку в нужном для организма направлении. Более определенной выглядит роль микроРНК, которые активируют или подавляют конкретное направление дифференцировки (см. таблицу).

Какие же факторы влияют на процесс дифференцировки? Точнее говоря, какую стадию коммитирования прогениторных клеток они запускают? Факторы, влияющие на МСК в нише, имеют разную природу – химическую, физическую и биологическую. К химическим следует отнести как эндогенные, так и экзогенные низкомолекулярные биологические соединения – IBMX, β GP, дексаметазон, индометацин, L-аскорбиновую кислоту, инсулин; к физическим – форму клетки, механическую пластичность, структуру и состояние экстраклеточного матрикса,

Роль микроРНК в регуляции дифференцировки МСК [20]
Role of miRNAs in the regulation of differentiation of MSCs [20]

МикроРНК	Белок, кодируемый геномом-мишенью	Эффект
miR-20a	TGFBR2 KDM6B	↑A ↑A
miR-26a	Smad1 GSK3β Tob1	↓O ↑O ↑O
miR-30e	LRP6 IGF2	↑A ↓O ↓O
miR-140	^b NEAT1 (incRNA)	↑A
miR-153	BMPR2	↓O
miR-188	HDAC9 RICTOR	↓O ↑A
miR-194	COUP-TFII	↑O ↑A
miR-199a-5p	N/A	↑O
miR-216a	c-Cbl	↑O
miR-223	FGFR2	↑A ↓O
miR-320	Runx2	↑A ↓O
miR-375	N/A	↑A
miR-455-3p	Runx2	↑CH

Примечание. ↑ – активация, ↓ – ингибирование, А – адипогенез, О – остеогенез, СН – хондрогенез.

пространственную локализацию критических структур, мембранный потенциал; к биологическим – возраст клетки, продукты метаболизма [20]. Конечно, действие перечисленных факторов сбалансировано таким образом, чтобы направить дифференцировку в нужном, с точки зрения интересов организма, направлении: если речь идет о костной ткани – в остеогенном, если о жировой – в адипогенном. Что же произойдет при нарушении этого баланса? Возникнут проблемы. Предварительный ответ на этот вопрос дают результаты опытов Р. Меуньер с соавт. [22], ранее изучавших соотношение остеогенной и адипогенной дифференцировки стволовых клеток костного мозга. Оказалось, что в случае сдвига в сторону адипогенности содержание в кости адипоцитов относительно остеобластов растет, как это имеет место, например, при остеопорозе. Сдвиг баланса нарушает все стадии процесса: запуск, коммитирование и образование остеобластов, т. е. формирование костной ткани. Можно предположить, что именно в разбалансировке кроются многие патологии костной ткани, включая остеопороз.

Дифференцировка МСК как инструмент получения клеток печени (гепатоцитов). При заболеваниях печени и в первую очередь при острой печеночной недостаточности внимание исследователей привлекает клеточная терапия, так как в области гепатологии до последнего времени не было практически никакой альтернативы трансплантации печени как лечебного приема, позволяющего спасти жизнь пациента. Росту такого интереса способствовали два обстоятельства: отсутствие полной информации о природе и биологии резидентных стволовых клеток печени (некоторые исследователи относят к ним так называемые овальные клетки) и способность МСК костного мозга и жировой ткани трансдифференцироваться в другие типы специализированных клеток наряду с их превращением в канонические типы клеток: адипоциты, остеобласты и хондробласты. Именно по этой причине были предприняты попытки разработать протоколы дифференцировки МСК в гепатоциты и холангиоциты *in vitro*.

Метаболические и синтетические функции печени обусловлены в основном влиянием гепатоцитов, на которые приходится порядка 60 % клеточного пула органа и которые занимают 80 %

от его объема [23, 24]. Другим важным типом печеночных клеток являются билиарные эпителиальные клетки – холангиоциты, образующие печеночные протоки разного уровня, по которым образующаяся в гепатоцитах желчь транспортируется в конечном счете в двенадцатиперстную кишку. Общим предшественником этих двух типов печеночных клеток являются гепатобласты – основные прогениторные клетки печени. Для гепатобластов характерны некоторые типичные для них признаки – экспрессия транскрипционных факторов *Hes* и *HNf4a* и белков альфа-фетопротеина и альбумина. К сожалению, до сих пор в печени не обнаружены резидентные стволовые клетки типа МСК, характеризующиеся определенными маркерными признаками. Именно поэтому в литературе обычно говорят о прогениторных клетках, рассматривая их в роли гепатобластов. Запутанность ситуации усугубляется и тем, что ткань печени сама обладает высокой регенеративной способностью. Так, например, при механическом повреждении или экспериментальной гепатэктомии она в состоянии восстанавливать свою структурную и морфофункциональную целостность благодаря, по всей видимости, тому, что гепатоциты способны претерпевать до 80 удвоений.

В настоящее время в рамках указанной проблемы рассматриваются две ситуации. Согласно представлениям, основанным на данных по эмбриогенезу у грызунов, гепатобласты – главные прогениторные клетки печени – образуются из прогениторных клеток мезотелия и энтодермы с участием разнообразных субклеточных факторов (факторов роста, низкомолекулярных регуляторных белков и даже клеток – фибробластов). Другим интересным моментом является обнаружение в печени грызунов и человека особых эпителиальных клеток, получивших из-за своей формы название овальных [25]. Они тоже обладают способностью к делению и участвуют в формировании желчных протоков, а кроме того, так же как гепатоциты и холангиоциты, экспрессируют альбумин и цитокератин 19. Однако информации об овальных клетках совсем немного, поэтому вопрос об их биологической роли все еще остается предметом дискуссий. Тем не менее, очевидно, что прогениторные клетки печени независимо от их природы дифференцируются билатерально в гепатоциты и холангиоциты – основные функционально активные клеточные компоненты печени.

Возвращаясь к протоколам дифференцировки МСК в клетках печени, следует отметить, что, независимо от того, какие клетки были взяты в качестве исходного материала (костномозговые, жиротканые или пуповинные), опыты *in vitro* увенчались успехом. Оказались успешными и опыты по дифференцировке гепатоцитов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [4]. В данной ситуации полученные дифференцированные МСК стали называть не гепатоцитами, а гепатоподобными клетками (ГПК).

Культуральная среда для дифференцировки МСК из жировой ткани достаточно сложная и включает набор ростовых факторов *HGF*, *EGF*, *TGF*, *ITS* (селен-цитозин трансферин), *OSM* (онкостатин) и дексаметазон (рис. 5). В методиках дифференцировки МСК из других источников использовали диметилсульфоксид или 5-азоцитидин. Последний, как известно, является деметилирующим реагентом [4].

ГПК характеризуются новыми приобретенными признаками: гепатоцитоподобной морфологией, экспрессией специфичных для гепатоцитов маркерных генов, наличием в их структуре гликогена и альбумина, окрашиванием клеток в зеленый цвет индоцианином, секрецией мочевины и активностью цитохрома P-450.

О том, что МСК дифференцируются в ГПК *in vivo*, данные противоречивы. Стойкая трансдифференцировка не регистрируется, если МСК человека трансплантируют в печень мыши. Судя по результатам одних работ, никакой дифференцировки трансплантированных МСК к печени крыс не происходит, а согласно другим данным, дифференцировка все же имеет место. Появились работы, в которых МСК могут приживаться и, следовательно, дифференцироваться в гепатоциты, если печень повреждена, т. е. само повреждение является пусковым сигналом дифференцировки [24].

Серьезным препятствием для разработки клеточных технологий лечения заболеваний печени являются существенные пробелы в понимании природы печеночных стволовых клеток. До сих пор нет ясности, имеются ли в ткани печени резидентные стволовые клетки, аналогичные МСК, обнаруженным в других тканях, хотя твердо установлено, что прогениторные клетки (предшественники

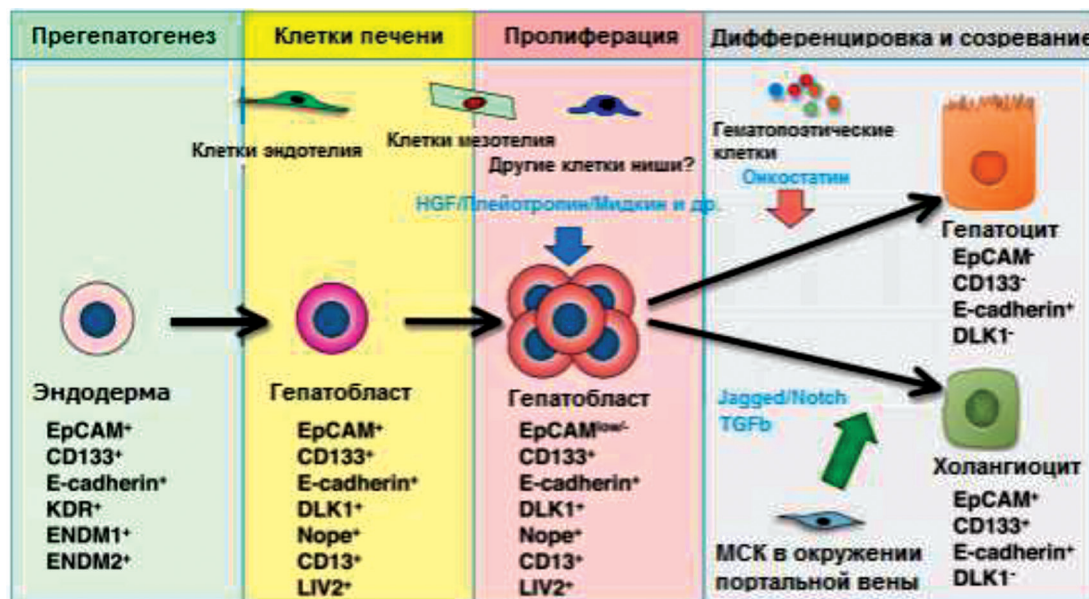


Рис. 5. Схема превращения прогениторных клеток печени в функционально активные клетки – гепатоциты и холангиоциты [26]. В каждом столбце приведен перечень транскрипционных факторов и регуляторных белков, контролирующих процесс превращения

Fig. 5. Scheme of the transformation of liver progenitor cells into functionally active hepatocyte cells and cholangiocytes [26]. Each column contains a list of transcription factors and regulatory proteins that control the conversion process

двух ключевых клеточных популяций печени – гепатоцитов и холангиоцитов) в них имеются. Это гепатоцитобласты – непосредственные предшественники двух описанных выше типов клеток. Как уже упоминалось, в роли стволовых клеток печени могут выступать овальные клетки, находящиеся в ее ткани и в тканях, окружающих желчные протоки. Они могут дифференцироваться сначала в гепатоцитобласты, а затем в гепатоциты и холангиоциты. Однако выделить их и, следовательно, культивировать *in vitro* до сих пор не удалось. Нет никакой информации о маркерных характеристиках этих клеток. В то же время приятной неожиданностью оказалась возможность экспериментально подвергнуть гепатогенной трансдифференцировке МСК из разных источников, которые обычно дифференцируются по трем каноническим направлениям: адипогенному, остеогенному и хондрогенному. Данные трансдифференцировки запускаются различными ростовыми факторами и другими еще слабо изученными эпигенетическими механизмами контроля гепатогенной трансдифференцировки, знание которых позволило бы активизировать этот процесс, сократить время превращения, повысить выход клеточного материала. Эта проблема требует специально изучения, и одним из подходов может быть тщательный анализ эпигенетических процессов в разных типах клеток (например, в стволовых и дифференцированных), который позволит выявить ключевые признаки плюрипотентности, т. е. установить сложные механизмы, определяющие клеточную «судьбу» в ходе развития, а следовательно, увеличить продолжительность жизни клетки. Предполагается, что эта информация может быть использована для перенастройки некоторых эпигенетических реакций организма, связанных в том числе со старением и различными заболеваниями, включая рак.

Заключение. Эпигенетические регуляторные механизмы метилирования ДНК, структурная модификация гистонов и микроРНК принимают активное участие в процессах репрограммирования, поддержания стволовости и направленной дифференцировки МСК. Эпигенетические механизмы функционируют на всех этапах жизнедеятельности организма, начиная от начальной стадии эмбрионального развития – деления клеток в бластоцисте, через коммитирование стволовых клеток в различные клеточные типы, и заканчивая определением их топографического распределения в тканях и органах. Кроме того, эти механизмы используются в таких основных клеточных процессах, как регуляция транскрипции, репликация ДНК, клеточный цикл и репара-

ция ДНК. Нарушение этих регуляторных процессов может стать причиной серьезных генетических патологий, включая дегенеративные заболевания органов и тканей. Например, «выпадение» ферментов, ответственных за деацетиляцию, связывают с летальностью эмбрионов, что подтверждает ключевую роль этих ферментов в эмбриональном развитии. Расшифровка роли метилирования и ацетилирования в контексте эпигенетической модификации дает возможность понять, каким образом могут повреждаться и репарироваться развивающиеся и сформированные органы. Вместе с тем понимание механизмов дифференцировки стволовых клеток и эпигенетического контроля этого процесса открывает перспективу разработки конкретных приемов увеличения дифференцированности стволовых клеток *in vitro*, что представляется чрезвычайно важным при лечении различных заболеваний.

Список использованных источников

1. Epigenetics / ed. : O. D. Allis [et al.]. – 2nd ed. – New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015. – 984 p.
2. Hoffmann, A. Molecular epigenetic switches in neurodevelopment in health and disease / A. Hoffmann, Ch. A. Zimmermann, D. Spengler // *Front Behav. Neurosci.* – 2015. – Vol. 9. – Art. 120. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00120>
3. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici [et al.] // *Cytotherapy.* – 2006. – Vol. 8, N 4. – P. 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
4. Progress in mesenchymal stem cell-based therapy for acute liver failure / Y.-H. Wang [et al.] // *Stem Cell Res. Ther.* – 2018. – Vol. 9. – Art. 227. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0972-4>
5. Li, X. Epigenetic regulation of mammalian stem cells / X. Li, X. Zhao // *Stem Cells Dev.* – 2008. – Vol. 17, N 6. – P. 1043–1052. <https://doi.org/10.1089/scd.2008.0036>
6. Epigenetic modulation of stem cells in neurodevelopment: the role of methylation and acetylation / M. Podobinska [et al.] // *Front Cell Neurosci.* – 2017. – Vol. 11, N 23. – Art. 23. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00023>
7. Epigenetic regulation of mesenchymal stem cells: a focus on osteogenic and adipogenic differentiation / C. M. Teven [et al.] // *Stem Cells Int.* – 2011. – Vol. 2011. – Art. ID 201231. <https://doi.org/10.4061/2011/201371>
8. The molecular hallmarks of epigenetic control / C. D. Allis, T. Jenuwein // *Nat. Rev. Genetics.* – 2016. – Vol. 17, N 8. – P. 487–500. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.59>
9. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain / J. U. Guo [et al.] // *Cell.* – 2011. – Vol. 145, N 3. – P. 423–434. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.022>
10. Moran-Salvador, E. Epigenetics and liver fibrosis / E. Moran-Salvador, J. Mann // *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.* – 2017. – Vol. 4, N 1. – P. 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.04.007>
11. Suganuma, T. Signals and combinatorial functions of histone modifications / T. Suganuma, J. L. Workman // *Annu. Rev. Biochem.* – 2011. – Vol. 80, N 1. – P. 473–499. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061809-175347>
12. Rothbart, S. B. Interpreting the language of histone and DNA modifications / S. B. Rothbart, B. D. Strahl // *Biochim. Biophys. Acta. Gene Reg. Mech.* – 2014. – Vol. 1839, N 8. – P. 627–643. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.03.001>
13. Jenuwein, T. Translating the histone code / T. Jenuwein, O. D. Allis // *Science.* – 2001. – Vol. 293, N 5532. – P. 1074–1080. <https://doi.org/10.1126/science.1063127>
14. Goldberg, A. D. Epigenetics: a landscape takes shape / A. D. Goldberg, C. D. Allis, E. Bernstein // *Cell.* – 2007. – Vol. 128, N 4. – P. 635–638. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.006>
15. WERAM: a database of writers, erasers and readers of histone acetylation and methylation in eukaryotes / Y. Xu [et al.] // *Nucl. Acids Res.* – 2017. – Vol. 45, N D1. – P. D264–D270. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1011>
16. New, M. HDAC inhibitor-based therapies: can we interpret the code? / M. New, H. Olzscha, N. B. La Thangue // *Mol. Oncol.* – 2012. – Vol. 6, N 6. – P. 637–656. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.09.003>
17. Moutinho C. MicroRNAs and epigenetics / C. Moutinho, M. Esteller // *Advances in Cancer Research* / ed. : C. M. Croce, P. B. Fish. – London, 2017. – Vol. 135 : miRNA and Cancer. – P. 189–220.
18. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation / J. Huang [et al.] // *Stem Cells.* – 2010. – Vol. 28, N 2. – P. 357–364. <https://doi.org/10.1002/stem.288>
19. Dykes, I. M. Transcriptional and post-transcriptional gene regulation by long non-coding RNA / I. M. Dykes, C. Emanuelli // *Genomics Proteomics Bioinformatics.* – 2017. – Vol. 15, N 3. – P. 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.12.005>
20. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? / Q. Chen [et al.] // *Cell Death Differ.* – 2016. – Vol. 23, N 7. – P. 1128–1139. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.168>
21. Non-coding RNA / J. S. Mattick [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 2006. – Vol. 15, suppl. 1. – P. R17–R29. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl046>
22. Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue. A quantitative study of 84 iliac bone biopsies / P. Meunier [et al.] // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – 1971. – Vol. 80. – P. 147–154. <https://doi.org/10.1097/00003086-197110000-00021>
23. Stem cells transplantation in the treatment of patients with liver failure / Y.-C. Tao [et al.] // *Curr. Stem Cell Res. Ther.* – 2018. – Vol. 13, N 3. – P. 193–201. <https://doi.org/10.2174/1574888X13666180105123915>
24. Miyajima, A. Stem/progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration, and reprogramming / A. Miyajima, M. Tanaka, T. Itoh // *Cell Stem Cell.* – 2014. – Vol. 14, N 5. – P. 561–574. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.04.010>

25. Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms / M. Tanaka [et al.] // J. Biochem. – 2011. – Vol. 149, N 3. – P. 231–239. <https://doi.org/10.1093/jb/mvr001>
26. *In vivo* hepatic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood after transplantation into mice with liver injury / J. Yu [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2012. – Vol. 422, N 4. – P. 539–545. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.156>

References

1. Allis O. D., Caparras M., Jenuwein T., Reinberg D. (ed.). *Epigenetics*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015. 984 p.
2. Hoffmann A., Zimmermann C. A., Spengler D. Molecular epigenetic switches in neurodevelopment in health and disease. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2015, vol. 9, art. 120. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00120>
3. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D. S., Deans R. J., Keating A., Prockop D. J., Horwitz E. M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006, vol. 8, no. 4, pp. 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
4. Wang Y.-H., Wu D.-B., Chen B., Chen E.-Q., Tang H. Progress in mesenchymal stem cell-based therapy for acute liver failure. *Stem Cell Research and Therapy*, 2018, vol. 9, no. 1, art. 227. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0972-4>
5. Li X., Zhao X. Epigenetic regulation of mammalian stem cells. *Stem Cells and Development*, 2008, vol. 17, no. 6, pp. 1043–1052. <https://doi.org/10.1089/scd.2008.0036>
6. Podobinska M., Szablowska-Gadomska I., Augustyniak J., Sandvig I., Sandvig A., Buzanska, L. Epigenetic modulation of stem cells in neurodevelopment: the role of methylation and acetylation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2017, vol. 14, art. 23. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00023>
7. Teven C. M., Liu X., Hu N., Tang N., Kim S. H., Huang E. [et al.]. Epigenetic regulation of mesenchymal stem cells: a focus on osteogenic and adipogenic differentiation. *Stem Cells International*, 2011, vol. 2011, art. ID 201231. <https://doi.org/10.4061/2011/201371>
8. Alles C. D., Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews Genetics*, 2016, vol. 17, no. 8, pp. 487–500. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.59>
9. Guo J. U., Su Y., Zhong C., Ming G., Song H. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*, 2011, vol. 145, no. 3, pp. 423–434. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.022>
10. Moran-Salvador E., Mann J. Epigenetics and liver fibrosis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2017, vol. 4, no. 1, pp. 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.04.007>
11. Suganuma T., Workman J. L. Signals and combinatorial functions of histone modifications. *Annual Review of Biochemistry*, 2011, vol. 80, no. 1, pp. 473–499. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061809-175347>
12. Rothbart S. B., Strahl B. D. Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Regulatory Mechanism*, 2014, vol. 1839, no. 8, pp. 627–643. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.03.001>
13. Jenuwein T., Allis O. D. Translating the histone code. *Science*, 2001, vol. 293, no. 5532, pp. 1074–1080. <https://doi.org/10.1126/science.1063127>
14. Goldberg A. D., Allis C. D., Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*, 2007, vol. 128, no. 4, pp. 635–638. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.006>
15. Xu Y., Zhang S., Lin S., Guo Y., Deng W., Zhang Y., Xue Y. WERAM: a database of writers, erasers and readers of histone acetylation and methylation in eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 2016, vol. 45, no. D1, pp. D264–D270. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1011>
16. New M., Olzscha H., La Thangue N. B. HDAC inhibitor-based therapies: Can we interpret the code? *Molecular Oncology*, 2012, vol. 6, no. 6, pp. 637–656. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.09.003>
17. Moutinho C., Esteller M. MicroRNAs and epigenetics. *Advances in Cancer Research*. Vol. 135. *miRNA and Cancer*. London, 2017, pp. 189–220.
18. Huang J., Zhao L., Xing L., Chen D. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. *Stem Cells*, 2009, vol. 28, no. 2, pp. 357–364. <https://doi.org/10.1002/stem.288>
19. Dykes I. M., Emanuelli C. Transcriptional and post-transcriptional gene regulation by long non-coding RNA. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 2017, vol. 15, no. 3, pp. 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.12.005>
20. Chen Q., Shou P., Zheng C., Jiang M., Cao G., Yang Q., Shi, Y. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? *Cell Death and Differentiation*, 2016, vol. 23, no. 7, pp. 1128–1139. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.168>
21. Mattick J. S., Makunin I. V. Non-coding RNA. *Human Molecular Genetics*, 2006, vol. 15, suppl. 1, pp. R17–R29. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl046>
22. Meunier P., Aaron J., Edouard C., Vignon G. Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1971, vol. 80, pp. 147–154. <https://doi.org/10.1097/00003086-197110000-00021>
23. Tao Y.-C., Wang M.-L., Chen E.-Q., Tang H. Stem cells transplantation in the treatment of patients with liver failure. *Current Stem Cell Research and Therapy*, 2018, vol. 13, no. 3, pp. 193–201. <https://doi.org/10.2174/1574888X13666180105123915>
24. Miyajima A., Tanaka M., Itoh T. Stem/progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration, and reprogramming. *Cell Stem Cell*, 2014, vol. 14, no. 5, pp. 561–574. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.04.010>

25. Tanaka M., Itoh T., Tanimizu N., Miyajima A. Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms. *Journal of Biochemistry*, 2011, vol. 149, no. 3, pp. 231–239. <https://doi.org/10.1093/jb/mvr001>

26. Yu J., Cao H., Yang J., Pan Q., Ma J., Li J., Li Y., Li J., Wang Y., Li L. *In vivo* hepatic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood after transplantation into mice with liver injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, vol. 422, no. 4, pp. 539–545. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.156>

Информация об авторах

Волотовский Игорь Дмитриевич – академик, д-р биол. наук, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: volotovskii@yahoo.com

Ермоленко Дарья Андреевна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ermolenko_darya94@gmail.ru

Горохова Надежда Игоревна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nadezhdanilina@gmail.com

Information about the authors

Igor D. Volotovskii – Academician, D. Sc. (Biol.), Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: volotovskii@yahoo.com

Darya A. Ermolenko – Junior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ermolenko_darya94@gmail.ru

Nadezhda I. Harokhava – Junior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nadezhdanilina@mail.com