

ОБРАЗОВАНИЕ СФЕРИЧЕСКИХ КОЛОНИЙ КАК СВОЙСТВО СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

© А. Н. Сукач,^{1,2} Э. Н. Иванов³¹ НИИ биологии Харьковского национального университета им. В. Н. Каразина,² Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины и³ Институт дерматологии и венерологии АМН Украины, Харьков;¹ электронный адрес: an_sukach@yahoo.co.uk

В работе продемонстрирована способность эмбриональных клеток, полученных из нервной, кровеносной и эпителиально-мышечной тканей человека, образовывать сферы в процессе культивирования *in vitro*. На основе анализа собственных и литературных данных выдвигается предположение о том, что образование колоний в виде сфер в условиях культивирования *in vitro* является общим признаком стволовых клеток различного происхождения и различной степени зрелости. При этом формирование сфер, возможно, обеспечивает развитие стволовых клеток в соответствии с их пространственным расположением, а также согласно темпоральной программы развития, специфической для каждого типа клеток.

Ключевые слова: эмбрион, стволовая клетка, колониеобразование, сфера, нейросфера, культура клеток.

Принятые сокращения: СК — стволовые клетки, ЭНК — эмбриональная нервная клетка, ЭТ — эмбрионные тельца, hbFGF — основной фактор роста фибробластов человека, hEGF — эпидермальный фактор роста человека, FBS — эмбриональная сыворотка телят.

В настоящее время наблюдается все возрастающий интерес исследователей к изучению стволовых клеток (СК) животных и человека. Интерес этот носит как фундаментальный, так и прикладной характер. Однако процесс изучения СК, в особенности человека, осложняется наличием некоторых трудноразрешимых в настоящее время задач. Так, технически сложной является задача идентификации и очистки СК из-за небольшого содержания их в ткани и недостатка универсальных морфологических особенностей (Blau et al., 2001). Большинство протоколов обогащения СК основывается на иммуносортировании с использованием наборов антител к поверхностным клеточным белкам. Однако такой метод требует использования дорогостоящего оборудования, а также ограничивается недостатком поверхностных клеточных маркеров, специфических для дифференцированных и недифференцированных клеток определенной ткани. Помимо этого, экспансия мультипотентных СК ограничивается недостатком соответствующих протоколов культивирования *in vitro*, создающих условия для их пролиферации в недифференцированном состоянии, подобным условиям *in vivo*. Разработка такого протокола для нервных СК, позволяющего культивировать недифференцированные нервные клетки в суспензии в виде нейросфер (Reynolds, Weiss, 1996; Weiss et al., 1996), послужила инструментом в различных экспериментальных системах, направленных на обогащение СК (Uchida et al., 2000) и сравнение профилей экспрессии генов СК (Geschwind et al., 2001) в моделях развития нервной системы *in vitro* (Caldwell et al., 2001).

В представленной работе на основании изучения способности эмбриональных клеток нервной, кровенос-

ной и эпителиально-мышечной тканей человека образовывать в процессе культивирования *in vitro* сферы, а также исходя из данных литературы предпринимается попытка обосновать сферообразование как свойство СК. Высказывается предположение о том, что сферообразование, с одной стороны, позволит осуществить экспансию СК с целью получения количества клеток, достаточного для научных и прикладных исследований, а с другой — создать адекватную модель для изучения *in vitro* процессов самовозобновления, коммитирования, пролиферации, дифференциации и миграции мультипотентных СК эмбриональных и взрослых тканей человека и животных.

Материал и методика

Выделение клеток. Эмбриональные клетки изолировали из тканей мозга, печени и эпителиально-мышечных тканей эмбрионов человека 6—12 нед гестации, полученных в результате легальных аборт и при соответствующей форме согласия женщин. Ткани изолировали, помещали в стерильный солевой раствор Хенкса (Sigma, США), содержащий пенициллин (100 U/мл), стрептомицин (100 мкг/мл) и гентамицин (50 U/мл), иссекали и механически дезагрегировали на единичные клетки (Грищенко и др., 2001). Полученную суспензию клеток фильтровали через нейлоновый фильтр. Жизнеспособность клеток оценивали по окрашиванию трипановым синим (0.4 %; Sigma, США) и выражали в %. Подсчет числа клеток производили в камере Горяева.

Клеточная культура. Клетки высевали в ростовую среду в концентрации $(1-2) \cdot 10^6$ кл./мл без предварительной отмывки. Культивирование клеток проводили в 24-луночных планшетах (Corning, Канада) при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Половину объема среды культивирования заменяли на свежую каждые 3—4 сут. При достижении клетками 80 % слитного роста их пересевали, предварительно обработав лунки 0.25%-ным раствором трипсина, содержащим 1 мМ ЭДТА, в течение 5 мин при 37 °С.

Клетки, полученные из эмбриональной печени и эпителиально-мышечных тканей, культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки телят (FBS), 3 мМ бикарбоната натрия, 10 мМ HEPES, 0.01 мМ β-меркаптоэтанол, 2 мМ глутамин и 7.5 мМ глюкозы. Через 3 сут культивирования неприкрепленные клетки удаляли.

Эмбриональные нервные клетки (ЭНК) культивировали в среде DMEM /F12. Среду обогащали 0.6 % глюкозы, 100 мкг/мл трансферрина, 25 мкг/мл инсулина, 20 нМ прогестерона, 30 нМ селенита натрия, 60 мкМ путресцина, 2 мМ глутамин, 3 мМ бикарбоната натрия, 5 мМ HEPES и 2 мкг/мл гепарина. Культивирование ЭНК проводили в присутствии 10 % FBS и без нее. В некоторых случаях среду обогащали эпидермальным фактором роста (hEGF, 200 нг/мл) и основным фактором роста фибробластов человека (hbFGF, 20 нг/мл). Через 3—4 сут культивирования производили пересев нервных клеток на покровные стекла, покрытые полиорнитинном. Дальнейшее культивирование проводили в обогащенной среде DMEM/F12 в присутствии FBS.

Все среды содержали 100 У/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 250 нг/мл фунгизона. Среды, все добавки в них, а также полиорнитин были от фирмы Sigma (США).

Для микроскопического анализа культур использовали световой микроскоп Olympus I 70× и цифровую фотокамеру Olympus (Япония).

Результаты

Средняя жизнеспособность суспензии клеток, полученной из эпителиально-мышечной ткани, составляла 47 %. Через 2 сут культивирования происходило прикрепление и распластывание значительного числа клеток. В то же время наблюдалось присутствие большого количества бесформенных агрегатов клеток и плавающего детрита. На 4-е сут культивирования после удаления неприкрепившихся клеток, агрегатов и детрита происходил интенсивный рост прикрепленных клеток, которые уже через 7—8 сут культивирования начинали формировать монослой (рис. 1, а). В некоторых случаях рост клеток был очень интенсивным, возникновение участков монослоя клеток отмечали уже через 3—4 сут культивирования. Через 6—8 сут культивирования происходило появление сферических клеточных колоний (рис. 1, б), которые при дальнейшем культивировании увеличивались в размерах. Некоторые из них при этом откреплялись. На 17-е сут культивирования плавающие колонии прикреплялись и составляющие их клетки начинали дифференцироваться и мигрировать.

При пересеве эпителиально-мышечных клеток, образовавших монослой, в лунки, обработанные желатином, уже на следующие сутки культивирования происходило прикрепление и распластывание практически всех посеянных клеток. Через 3—4 сут культивирования часто про-

исходило образование звездчатых клеточных структур. Через 6 сут культивирования наблюдали появление прикрепленных сферических колоний клеток (рис. 1, в), которые достаточно часто формировались именно на звездчатых клеточных структурах. В процессе культивирования колонии откреплялись и плавали в суспензии, увеличиваясь в размерах (рис. 1, г). При дальнейшем культивировании колонии прикреплялись, составляющие их клетки дифференцировались и мигрировали. При этом клетки, образующиеся из этих сферических колоний, морфологически были сходны с клетками, образующими первичный монослой.

Жизнеспособность исходной суспензии стромальных клеток эмбриональной печени находилась в пределах 60—70 %. Как и в случае эпителиально-мышечных клеток, культивирование в течение 2 сут помимо наличия прикрепленных и распластанных фибробластоподобных клеточных агрегатов и детрита. На 14-е сут культивирования появлялись прикрепленные колонии клеток в виде сфер (рис. 2, а), которые в процессе культивирования откреплялись и увеличивались в размерах (рис. 2, б). При дальнейшем культивировании сферические колонии появлялись с периодичностью 3—4 сут. После посева эти колонии прикреплялись, составляющие их клетки дифференцировались и мигрировали, формируя в дальнейшем монослой. Морфологически клетки монослоя имели фибробластоподобный вид. Возможно, эти клетки являются мезенхимными. Однако это предположение требует дополнительных исследований.

Жизнеспособность свежeweделенных ЭНК колебалась в пределах от 23 до 0 %, что, очевидно, зависело от времени ишемии эмбрионов. При посеве в среду, не содержащую FBS и обогащенную факторами роста hbFGF и hEGF, через 5 ч культивирования наблюдали прикрепление части единичных клеток к поверхности лунок. Через 3 сут часть прикрепленных клеток пролиферировала и образовывала сферические колонии нервных клеток — нейросферы (рис. 3, а), которые затем отделялись от пластика и плавали в суспензии, увеличиваясь в размерах (рис. 3, б). После переноса их на покрытые полиорнитинном предметные стекла в среду без митогенов, содержащую FBS, все нейросферы прикреплялись, составляющие их клетки активно дифференцировались и мигрировали. При этом морфологически эти клетки напоминали нейроны и астроциты.

Культивирование ЭНК в среде, содержащей FBS, приводило к прикреплению небольшого количества клеток, некоторые из которых начинали распластываться. Неприкрепленные клетки образовывали сферические плавающие агрегаты (Сукач, 2005), размеры, структура и количество которых зависели от концентрации посеянных клеток и их исходной жизнеспособности. Через 3 сут культивирования агрегаты клеток дезагрегировали путем пипетирования, пересевали на покрытые полиорнитинном покровные стекла и культивировали в присутствии FBS. При этом уже через несколько часов культивирования происходило прикрепление единичных клеток и частей разрушенных клеточных агрегатов. Единичные клетки в процессе дальнейшего культивирования распластывались, а клетки, составляющие фрагменты агрегатов, дифференцировались и мигрировали. В конечном итоге происходило образование монослоя клеток. На 4-е и 8—9-е сут культивирования появлялись прикрепленные сферические колонии (нейросферы) (рис. 3, в), которые в

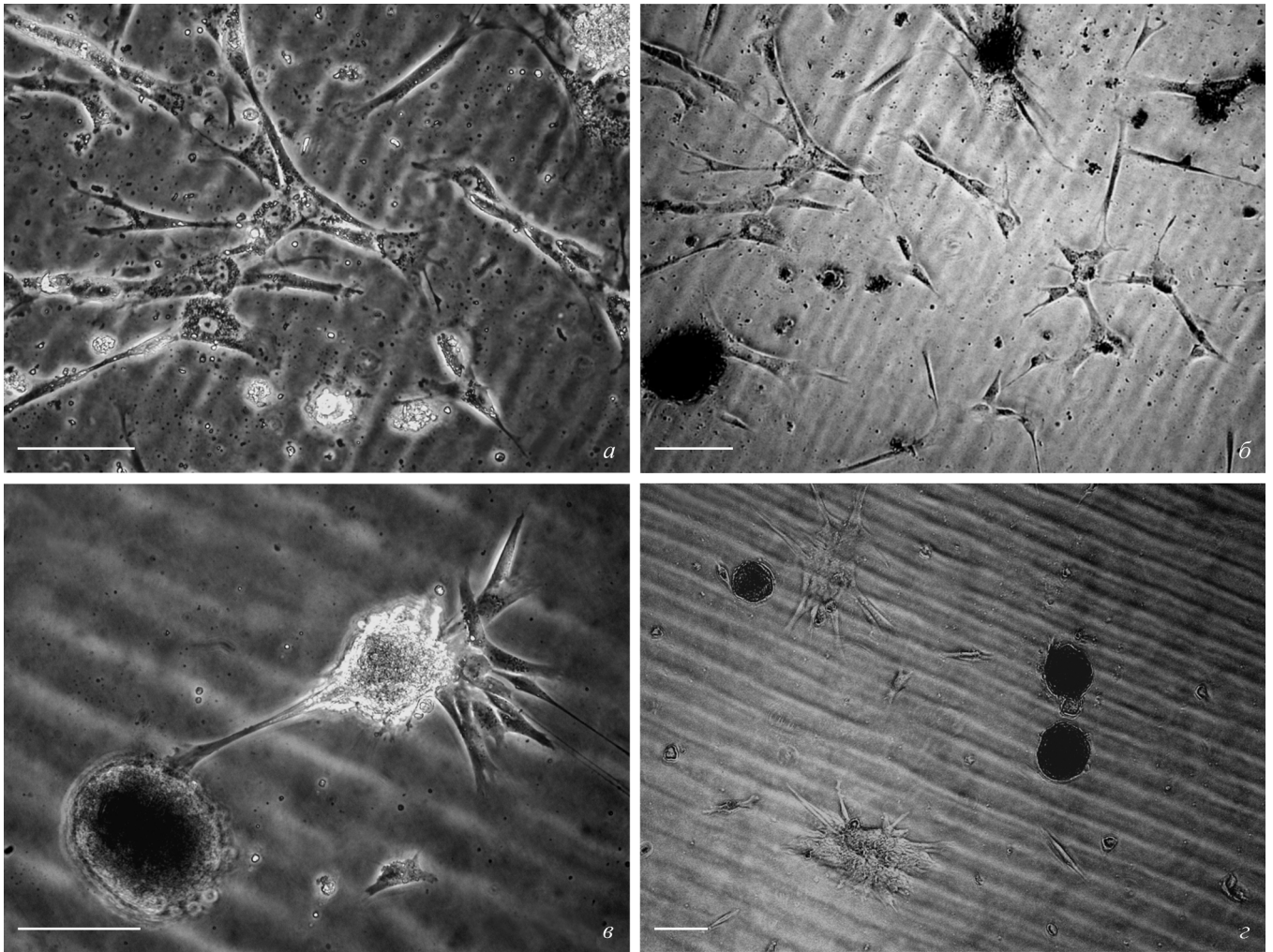


Рис. 1. Распластывание и формирование монослоя клетками эпителиально-мышечной ткани эмбрионов человека (а), которые образуют сферические клеточные колонии (б), и образование прикрепленных колоний (в), которые в процессе культивирования открепляются и плавают в суспензии(г).

Масштабные отрезки — 100 мкм.

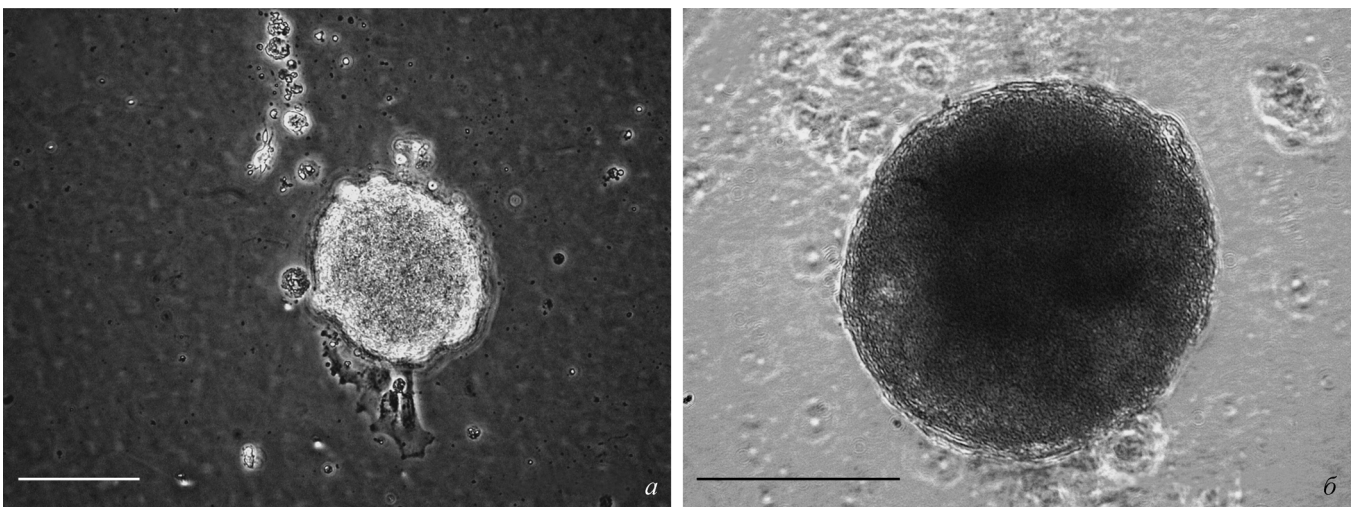


Рис. 2. Образование эмбриональными клетками печени прикрепленных сферических колоний (а), которые в процессе культивирования открепляются и увеличиваются в размерах (б).

Масштабные отрезки — 100 мкм.

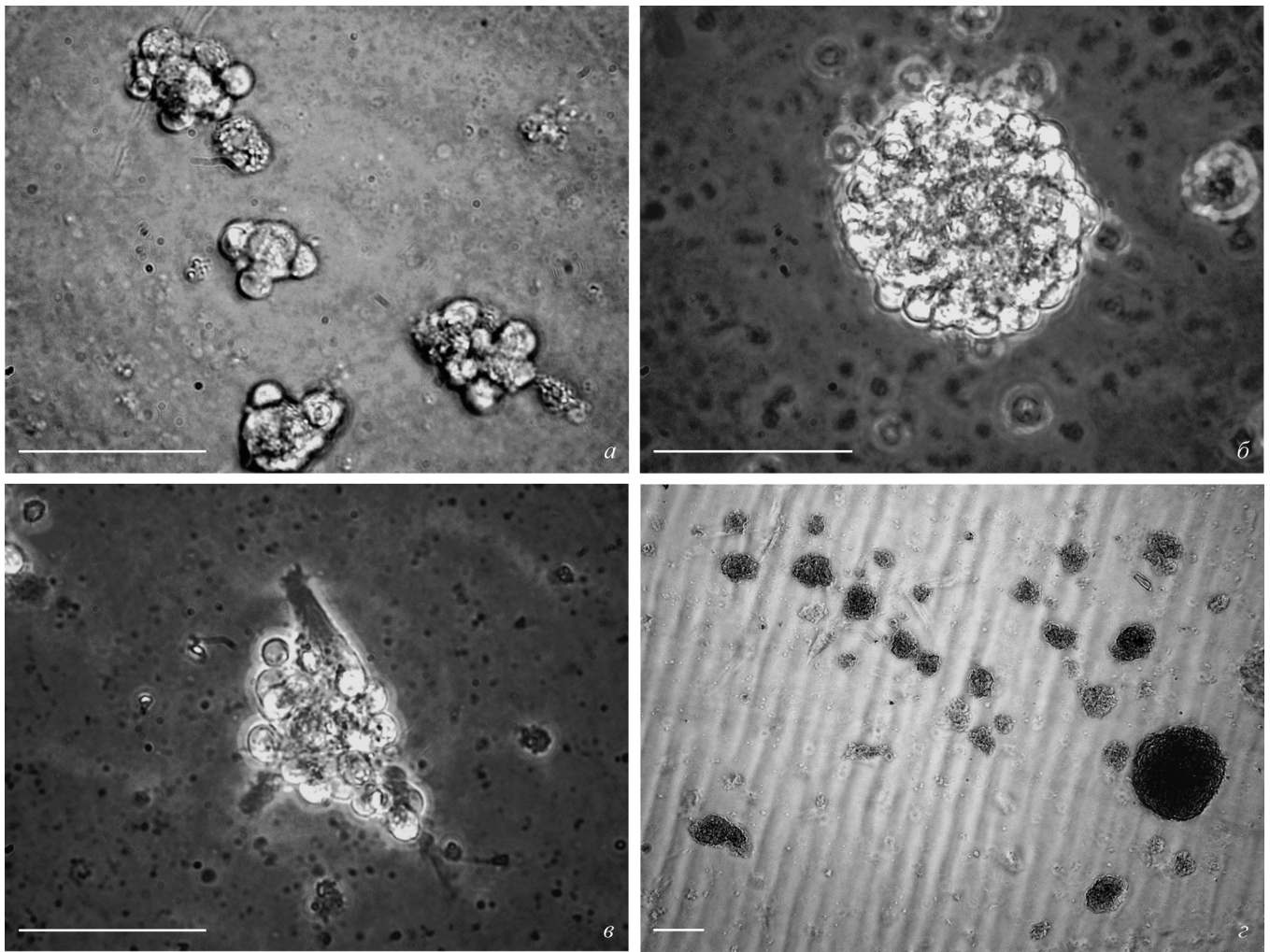


Рис. 3. Примеры образования эмбриональными нервными клетками человека нейросфер при культивировании в отсутствие сыворотки, но в присутствии факторов роста hFGF и hEGF (а, б) и в присутствии эмбриональной сыворотки телят (в, з).

Масштабные отрезки: а–в — 50, з — 100 мкм.

дальнейшем откреплялись и плавали в среде культивирования (рис. 3, з). При этом они, как правило, увеличивались в размерах. Через 11 сут плавающие нейросферы начинали прикрепляться и дифференцироваться. Через 13 сут происходило прикрепление всех плавающих нейросфер. В процессе дальнейшего культивирования появление нейросфер происходило с периодичностью 3–4 сут. На протяжении следующих 3–4 сут они плавали в среде культивирования, увеличиваясь в размерах, после чего прикреплялись, составляющие их клетки дифференцировались и мигрировали. При этом образовывались как нейроны, так и клетки глии (Сукач, 2005).

Следует отметить, что, как правило, во всех исследуемых клеточных культурах активное образование сферических колоний наблюдалось на следующие сутки после замены среды культивирования.

Обсуждение

Результаты экспериментов, представленные в настоящей работе, а также данные литературы указывают на то, что образование колоний в виде неприкрепленных сфер в условиях культивирования *in vitro* характерно как для эм-

бриональных (Doetschman et al., 1985; Keller, 1995; Reynolds, Weiss, 1996), так и для «взрослых» (Romero-Ramos et al., 2002; Dontu et al., 2003; Hermann et al., 2004; Kang et al., 2004; Yokoo et al., 2005) стволовых (прогениторных) клеток. При этом следует отметить, что колонии в виде сфер образуют как плюрипотентные СК, полученные из клеток внутренней массы эмбрионов стадии бластоцисты (Doetschman et al., 1985; Keller, 1995), так и мультипотентные СК более поздних сроков эмбрионального и постнатального развития, происходящие из различных зародышевых слоев (Reynolds, Weiss, 1996; Romero-Ramos et al., 2002; Dontu et al., 2003; Hermann et al., 2004; Kang et al., 2004; Yokoo et al., 2005).

Как показывают наши эксперименты, свежeweделенные эмбриональные клетки нервной ткани человека *in vitro* образуют плавающие нейросферы при культивировании как в среде, не содержащей FBS в присутствии факторов роста (hFGF и hEGF), так и в среде, содержащей FBS. При этом после прикрепления нейросферы активно дифференцируются в нейроны и клетки глии (Сукач, 2005).

Следует заметить, что если образование нейросфер в суспензионных культурах в отсутствие FBS и в присутствии факторов роста (hEGF и hFGF) и гормонов (инсулина) описано достаточно хорошо (Reynolds, Weiss, 1996;

Weiss et al., 1996), то образование нейросфер в условиях культивирования, способствующих дифференциации стволовых (прогениторных) клеток, в доступной нам литературе не описано.

Как известно (Suslov et al., 2002), нейросферы образуются клоноформирующими СК различной степени зрелости. Полученные нами результаты указывают на присутствие таких клеток в дифференцирующихся культурах нервных стволовых (прогениторных) клеток по крайней мере на протяжении 9 сут культивирования. При этом, исходя из полученных данных, появление новых нейросфер было связано с заменой среды культивирования, содержащей FBS, которая, как известно, является источником цитокинов и факторов роста, что позволяет предположить ее стимулирующее влияние на образование нейросфер СК. Возможно, причиной, вызывающей образование нейросфер в этих культурах, является комплексное влияние FBS и клеточного окружения на нервные СК. Уменьшение сферообразования в процессе культивирования ЭНК в условиях, стимулирующих дифференциацию, указывает на истощение колониеобразующих клеток, которое может быть следствием как коммитирования СК, так и низкого уровня их самовозобновления в этой системе культивирования. Однако это предположение требует дополнительных доказательств.

Представленные данные также указывают на то, что в процессе культивирования в монослойной культуре эмбриональные клетки эпителиально-мышечных тканей и клетки эмбриональной печени человека также образуют прикрепленные колонии в виде сфер (рис. 1, 2), которые в процессе культивирования открепляются и растут, увеличиваясь в размерах. В конечном итоге эти сферы прикрепляются, составляющие их клетки активно дифференцируются и мигрируют. При этом образующиеся в результате дифференциации клетки морфологически не имеют сходства с нейронами и клетками нейроглии, в противоположность тому, как это наблюдается в случае дифференциации клеток, составляющих нейросферы.

Образование колоний в виде сфер эпителиально-мышечными клетками и клетками печени эмбрионов человека указывает на существование в этих культурах стволовых колониеформирующих клеток. С другой стороны, образование колоний в виде сфер эмбриональными клетками печени, нервной и эпителиально-мышечной тканей указывает на то, что сферообразование не ограничивается только нервными СК, а является общим признаком стволовых (прогениторных) клеток. Подтверждением этого предположения являются многочисленные экспериментальные данные, описывающие образование «нейросфер» не нервными СК, культивируемыми в условиях, разработанных для нервных клеток: СК стромы костного мозга крыс (Lu et al., 2002), обезьян (Kang, 2004) и человека (Hermann et al., 2004); СК, полученными из ткани мышц взрослых мышей (Romero-Ramos et al., 2002); СК жировой ткани взрослых обезьян (Kang, 2004); эндотелиальными СК роговицы глаза человека (Yokoo et al., 2005).

Однако использование термина «нейросфера» для сферических колоний, образованных не нервными СК, на наш взгляд, представляется довольно спорным, хотя и показано, что клетки, составляющие эти сферы, экспрессируют маркеры нервных клеточных линий (Hermann et al., 2004; Kang, 2004; Yokoo et al., 2005). Это тем более спорно, что данные об образовании нервных клеточных линий не нервными мультипотентными СК *in vivo* достаточно противоречивы и многими исследователями подвергаются сомнению (Bertani et al., 2005; Massengale et al., 2005).

Возможно, условия культивирования, разработанные для нервных СК, способствуют выживанию, развитию и пролиферации только нервных предшественников, угнетая при этом другие клеточные линии.

Очевидно, можно подобрать условия, при которых мультипотентные ненервные СК будут образовывать сферические колонии клеточных линий, специфические для данной ткани. Это предположение помимо наших данных подтверждает разработка протокола, позволяющего выращивать эпителиальные клетки грудной железы взрослого человека в виде плавающих сферических колоний (авторы назвали их «маммосферами») (Dontu, 2003). Подобно образованию нейросфер, формирование маммосфер происходит в отсутствие сыворотки, но в присутствии EGF или bFGF. При этом клетки, образующие маммосферы, претерпевают ограниченное самовозобновление и способны к мультилинейной дифференциации в клеточные линии грудной железы. Большинство белков внеклеточного матрикса, обнаруженных в маммосферах, ассоциируются с эмбриональным развитием. Сравнительный анализ конфигурации транскрипции клеток, составляющих маммосферы, с конфигурацией транскрипции эмбриональных и взрослых нервных и гемопоэтических СК (Ivanova et al., 2002) показал высокую степень наложения генов, экспрессированных в клетках, составляющих маммосферы, и во взрослых, и эмбриональных гемопоэтических, и нервных СК. Сходные профили экспрессии обуславливают и сходный фенотип клеток, а также похожее их поведение при культивировании в одинаковых или близких условиях. При этом СК различных тканей могут образовывать колонии в виде сфер.

Как уже упоминалось ранее, образование сфер свойственно не только мультипотентным, но и плюрипотентным СК (клеткам внутренней массы эмбрионов стадии бластоцисты), которые в условиях культивирования *in vitro* образуют сферические колонии, называемые эмбриоидными тельцами (ЭТ). ЭТ представляют собой трехмерные колонии эмбриональных СК, которые первоначально образуются в результате их агрегации. Считается, что трехмерная структура ЭТ, которая увеличивает межклеточные взаимодействия, может быть важной для некоторых программ развития. Так, было показано (Hamazaki et al., 2004), что процесс агрегации играет важную роль в регуляции экспрессии генов; к тому же в ЭТ происходит образование цитокинов и индуцирующих факторов, обеспечивающих коммитирование СК в линейном направлении трех эмбриональных зародышевых слоев — мезодермы, энтодермы и эктодермы. По мнению многих исследователей, ЭТ представляют собой модель раннего эмбрионального развития.

В свою очередь нейросферы представляются многими исследователями как *in vitro*-модель эмбрионального нейrogenеза (Suslov et al., 2002). При этом в нейросферах происходят довольно сложные процессы, обусловленные как степенью зрелости сфероформирующей клетки, так и межклеточными взаимодействиями и влиянием микроокружения, приводящими как к самовозобновлению СК, так и к их коммитированию и дальнейшей пролиферации (Suslov et al., 2002). Данные о клеточном составе маммосфер также позволяют говорить о том, что они представляют собой *in vitro*-модель развития грудной железы (Dontu et al., 2003). Таким же образом можно предположить, что СК и других тканей *in vitro* способны формировать колонии в виде сфер, представляющих собой модель их эмбрионального развития.

Каждый этап эмбрионального развития характеризуется реализацией определенной программы, заложенной в геноме СК, которая проявляется в ее самовозобновлении, коммитировании, пролиферации и дифференциации. В условиях *in vivo* реализация этой программы зависит от пространственного расположения клетки, плотности клеточной популяции, межклеточных взаимодействий и степени зрелости клетки (Gehring, 1996; Cai et al., 1997; Bell et al., 1999; Hagedorn et al., 2000; Su, 2000), т. е. регулируется пространственно-временными факторами. Отсутствие какого-либо из этих факторов приводит к аномалиям развития либо к клеточной смерти. Вероятно, сферообразование в условиях *in vitro* является результатом «стремления» СК воссоздать условия, максимально приближенные к условиям их функционирования *in vivo*. Действительно, как видно из представленных выше данных, в сферах происходят процессы, характерные для эмбрионального развития СК, — самовозобновление, коммитирование и пролиферация.

Очевидно, что сферы, образуемые плюрипотентными и мультипотентными клетками, различаются. Так, сферы, образованные плюрипотентными СК, повторяют развитие раннего эмбриона, состоят из клеток трех зародышевых слоев и характеризуются самовозобновлением СК. Сферы, образованные мультипотентными СК, повторяя развитие ткани, из которой они происходят, представляют собой гетерогенную клеточную популяцию, состоящую из самовозобновляющихся СК различной степени зрелости и коммитированных клеток, способных к пролиферации и дифференциации. Однако функционально образование сфер в обоих случаях одинаково и является пространственной структурой, в которой возможна реализация зависимой от времени программы развития, заложенной в геноме СК.

Таким образом, можно предположить, что образование колоний в виде сфер в процессе культивирования *in vitro* является общим признаком СК различной степени зрелости, позволяющим обеспечить их развитие в соответствии с пространственно-временными факторами.

В заключение можно сказать, что сферы представляют интерес не только как модель эмбрионального развития СК различной степени зрелости, позволяющую исследовать особенности процессов их самовозобновления, созревания, коммитирования, пролиферации и дифференциации. Сферы могут также являться эффективным источником клеток для научных исследований и прикладного применения, включая генную инженерию, клеточную терапию, токсикологию и скрининг лекарственных препаратов. Поэтому создание протоколов, позволяющих выращивать стволовые (прогениторные) клетки различных тканей в виде сфер, представляется важной задачей на пути исследования и практического применения СК человека и животных.

Авторы выражают благодарность д-ру Джоу Ганн (Zhou Qun, Jilin University, Китай) за помощь в приобретении антител и митогенов, а также О. А. Семенченко за помощь в подготовке рукописи.

Список литературы

Грищенко В. И., Петренко О. Ю., Сукач О. М. 2001. Спосіб отримання клітин із ембріонів людини. Пат. № 36518А МПК с 1215/00. Заявлено 28.12.99. Опубл. 16.04.01. Бюл. Промислова власність. 3 : 1.116.

Сукач А. Н. 2005. Характеристика эмбриональных нервных клеток человека, полученных неферментативным способом. Цитология. 47 (3) : 207—213.

Bell E., Wingate R. J., Lumsden A. 1999. Homeotic transformation of rhombomere identity after localized Hox-b1 misexpression. Science. 284 : 2168—2171.

Bertani N., Malatesta P., Volpi G., Sonogo P., Perris R. 2005. Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells revisited: analysis by immunostaining, timelapse video and microarray. J. Cell Sci. 118 : 3925—3936.

Blau H. M., Brazelton T. R., Wimmann J. M. 2001. The evolving concept of a stem cell: entity or function? Cell. 105 : 829—841.

Cai L., Hayes N. L., Nowakowski R. S. 1997. Synchrony of clonal cell proliferation and contiguity of clonally related cells: production of mosaicism in the ventricular zone of developing mouse neocortex. J. Neurosci. 17 : 2088—2100.

Caldwell M. A., He X., Wilkie N., Pollack S., Marshall G., Wafford K. A., Svendsen C. N. 2001. Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres. Nat. Biotechnol. 19 : 475—479.

Doetschman T. C., Eistetter H., Katz M., Schmidt W., Kemler R. 1985. The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. J. Embryol. Exp. Morphol. 87 : 27—45.

Dontu G., Abdallah W. M., Foley J. M., Jackson K. W., Clarke M. F., Kawamura M. J., Wicha M. S. 2003. *In vitro* propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. Genes Develop. 17 : 1253—1270.

Gehring W. J. 1996. The master control gene for morphogenesis and evolution of the eye. Genes Cells. 1 : 11—15.

Geschwind D. H., Ou J., Easterday M. C., Dougherty J. D., Jackson R. L., Chen Z., Antoine H., Terskikh A., Weissman I. L., Nelson S. F., Kornblum H. I. 2001. A genetic analysis of neural progenitor differentiation. Neuron. 29 : 325—339.

Hagedorn L., Floris J., Suter U., Sommer L. 2000. Autonomic neurogenesis and apoptosis are alternative fates of progenitor cell communities induced by TGFβ. Develop. Biol. 228 : 57—72.

Hamazaki T., Oka M., Yamanaka S., Terada N. 2004. Aggregation of embryonic stem cells induces Nanog repression and primitive endoderm differentiation. J. Cell Sci. 117 : 5681—5686.

Hermann A., Gastl R., Liebau S., Popa O., Fiedler J., Boehm B. O., Maisel M., Lerche H., Schwarz J., Brenner R., Storch A. 2004. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. J. Cell Sci. 117 : 4411—4422.

Ivanova N. B., Dimos J. T., Schaniel C., Hackney J. A., Moore K. A., Lemischka I. R. 2002. A stem cell molecular signature. Science. 298 : 601—604.

Kang S. K., Putnam L. A., Ylostalo J., Popescu I. R., Dufour J., Belousov A., Bunnell B. A. 2004. Neurogenesis of rhesus adipose stromal cells. J. Cell Sci. 117 : 4289—4299.

Keller G. 1995. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells. Curr. Opin. Cell Biol. 7 : 862—869.

Lu D., Li Y., Mahmood A., Wang L., Rafiq T., Chopp M. 2002. Neural and marrow-derived stromal cell sphere transplantation in a rat model of traumatic brain injury. J. Neurosurg. 97 : 935—940.

Massengale M., Wagers A. J., Vogel H., Weissman I. L. 2005. Hematopoietic cells maintain hematopoietic fates upon entering the brain. JEM. 201 : 1579—1589.

Ramalho-Santos M., Yoon S., Matsuzaki Y., Mulligan R. C., Melton D. A. 2002. «Stemness»: transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. Science. 298 : 597—600.

Reynolds B. A., Weiss S. 1996. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. Develop. Biol. 175 : 1—13.

Romero-Ramos M., Vourc'h P., Young H. E., Lucas P. A., Young Wu, Chivatakarn O., Zaman R., Dunkelman N., El-Kalay M. A., Chesselet M. 2002. Neuronal differentiation of stem cells isolated from adult muscle. J. Neurosci. Res. 69 : 894—907.

Su T. T. 2000. The regulation of cell growth and proliferation during organogenesis. In Vivo. 14 : 141—148.

Suslov O. N., Kukekov V. G., Ignatova T. N., Steindler D. A. 2002. Neural stem cell heterogeneity demonstrated by molecular phynotyping of clonal neurospheres. PNAS. 99 : 14 506—14 511.

Ushida N., Buck D. W., He D., Reitsma M. J., Masek M., Phan T. V., Tsukamoto A. S., Gage F. H., Weissman I. L. 2000. Direct isolation of human central nervous system stem cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 97 : 14 720—14 725.

Weiss S., Reynolds B. A., Vescovi A. L., Morshead C. M., Craig C. G., van der Kooy D. 1996. Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? Trends Neurosci. 19 : 387—393.

Yokoo S., Yamagami S., Yanagi Y., Uchida S., Mimura T., Usui T., Amano S. 2005. Human corneal endothelial cell precursors isolated by sphere-forming assay. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 46 : 1626—1631.

Поступила 22 XI 2006

FORMATION OF SPHERICAL COLONIES AS A PROPERTY OF STEM CELLS

A. N. Sukach,^{1,2} E. N. Ivanov³

¹ Scientific-Research Institute of Biology, V. N. Karazin Kharkov National University,

² Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, and ³ Institute of Dermatology and Venereology of the Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkov;

¹ e-mail: an_sukach@yahoo.co.uk

The report deals with the ability of embryonic cells harvested from the nervous, hematopoietic and epithelial-muscular human tissues to form spheres during *in vitro* culturing. Judging from their own data and those reported elsewhere, the authors have hypothesized that formation of spherical colonies *in vitro* is a common feature of stem cells of various origin and varying degree of maturation. Probably, the formation of spheres provides for development of stem cells according to the locations and their inner temporal programs, which are specific and particular for every type of cells.

Key words: embryo, stem cell, colony formation, sphere, nuerosphere, cell culture.