

УДК 616

РАЗВИТИЕ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В РАННЕМ ЭМБРИОНЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Обзор

© 2019 С.А. Рыбцов^{1*}, М.А. Лагарькова²

¹ MRC Centre for Regenerative Medicine, University of Edinburgh, EH16 4U, Edinburgh, United Kingdom; E-mail: srybtsov@ed.ac.uk

² Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России, 119435 Москва, Россия; электронная почта: lagar@rcpctm.org

Поступила в редакцию 20.11.2018

После доработки 04.12.2018

Принята к публикации 04.12.2018

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) – первый тип стволовых клеток, обнаруженных в организме человека. Их существование было предсказано А.А. Максимовым и экспериментально доказано Тиллом и Мак-Каллоком. ГСК – первые стволовые клетки, которые были успешно применены в терапии и до сих пор активно используются. Даже единственная ГСК способна дать начало всем типам клеток крови при внутривенной трансплантации. Множество исследований последних десятилетий было посвящено изучению происхождения и иерархии ГСК, определению их молекулярного фенотипа в организме человека и животных, а также особенностям их функционирования и развития. В связи с постоянной потребностью в донорской крови и ГСК, пригодных для терапевтических трансплантаций, в последние годы рассматривается экспериментальная возможность получения ГСК *in vitro* путем направленной дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток (ПСК). Однако, несмотря на все усилия, пока не удается воспроизвести *in vitro* онтогенез ГСК и получить клетки, способные к долговременному поддержанию кроветворения. Изучение гемопоэза и его становления в эмбриональном развитии не только облегчает создание и усовершенствование протоколов получения клеток крови из ПСК, но и позволяет лучше понять патогенез различных видов пролиферативных заболеваний крови, анемий и иммунодефицитов. Данный обзор посвящен развитию кроветворения в онтогенезе млекопитающих.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), предшественники клеток крови, иерархия кроветворения, развитие мышц, гемопоэз человека, АГМ, эмбрион.

DOI: 10.1134/S0320972519030023

Число постоянно появляющихся и гибнущих клеток крови в организме млекопитающих очень велико. За жизнь человека продуцируется ~5 тонн клеток крови. Подсчитано, что каждую минуту в костном мозге производится ~300 млн клеток [1–3]. Подобная клеточная продукция должна строго регулироваться, т.к. необходимо поддержание баланса между пролиферацией клеток и их гибелью, нужны системы стимулирующих и ингибирующих сигналов, регулирую-

щих процессы кроветворения. Все линии гемопоэтической дифференцировки (миелоидные клетки – эритроциты, нейтрофилы, гранулоциты, моноциты, мегакариоциты; лимфоидные клетки – лимфоциты, естественные киллеры) происходят из стволовых клеток крови, или гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Многочисленный пул ГСК и мультипотентных предшественников хранится в костном мозге. Однако только ГСК через сложную иерархическую

Принятые сокращения: АГМ – регион аорты гонад и мезонефроса в раннем эмбрионе; ГСК – гемопоэтические стволовые клетки; ГЭ – гемогенный эндотелий; д.п.ф. – количество дней после фертилизации; E9 – 9-й день эмбрионального развития мышей; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; МЛП – мезодерма латеральной пластинки; ЭГП – эндотелиально-гематопоэтический переход; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; ЭЧМ – эмбриональный материал человека; про-ГСК – первый предшественник ГСК (E9); пре-ГСК-I – предшественник ГСК I типа (E10), пре-ГСК-II – предшественник ГСК II типа (E11); CS – стадии развития эмбрионов человека по Карнеги; NSG – иммунодефицитные мыши без T-, B- и НК-клеток (NOD/LtSz-scid IL2R gamma null); TGFβ – трансформирующий фактор роста бета.

Официальные названия генов приведены в соответствии с базой данных GeneCards <https://www.genecards.org/>.

* Адресат для корреспонденции.

систему дифференцировки клеток-предшественников обеспечивают самообновление кроветворной системы в организме млекопитающих [3, 4].

Иерархия клеток-предшественников в кроветворной системе представлена несколькими отделами, которые были определены физиологическими методами [5–8].

Отдел стволовых клеток включает клетки, способные к мультипотентной дифференцировке во все линии кроветворных клеток и обладающие высоким пролиферативным потенциалом. Они могут полностью восстановить кроветворение в облученном организме (их положение в иерархии зависит от способности осуществлять длительную или кратковременную репопуляцию костного мозга).

Олигопотентные клетки-предшественники – родоначальники только нескольких линий крови, таких как общие миелоидные предшественники (дающие моноциты, мегакариоциты, эритроциты) и общие лимфоидные предшественники (дающие В-, Т- и НК-клетки). Более низкую ступень в иерархии занимает отдел уни- и бипотентных клеток-предшественников, способных к одной или двум дифференцировкам.

Стволовые клетки крови являются, пожалуй, самыми первыми стволовыми клетками взрослого организма, известными науке. Еще в 1903 г. русский ученый А.А. Максимов, наблюдая за поведением клеток крови, ввел понятие «стволовая клетка» [9–11].

Позднее эксперименты, проведенные канадскими учеными Тиллом и Мак-Каллоком, показали, что при трансплантации клеток селезенки или костного мозга облученным экспериментальным животным обнаруживаются кластеры делящихся клеток в селезенке реципиентов. Клетки, образующие такие кластеры, назвали колониеобразующими единицами селезенки – КОЕ-С (colony-forming units in spleen, CFU-S). КОЕ-С были позже охарактеризованы как полипотентные предшественники крови. Обнаружение этих клеток считается первым экспериментальным подтверждением существования стволовых клеток крови [12, 13].

Истоки кроветворения начали искать в эмбриональном развитии. Изучая кроветворение птиц, профессор Дитерлин-Ливр показала в экспериментах по пересадке желточного мешка и эмбрионального зачатка на химерных эмбрионах курицы и перепела, что основной вклад в кроветворение, происходящее во взрослом организме, вносят клетки тела эмбриона, но не экстраэмбриональных тканей желточного мешка [14]. Однако лишь позднее, с разработкой методики анализа вклада в кроветворение донорс-

ких ГСК, была проведена более полная характеристика их свойств. ГСК у млекопитающих, в т.ч. у человека, образуются в период эмбрионального развития [15–18].

Онтогенез кроветворной системы позвоночных характеризуется двумя отдельными процессами: 1) эмбриональным кроветворением, при котором образуются транзиторные популяции кроветворных клеток, такие как примитивные эритроциты и некоторые миелоидные клетки; 2) постоянным, или дефинитивным, кроветворением, которое происходит позже в развитии из дефинитивных ГСК и приводит к возникновению всех зрелых (эритроидных, миелоидных и лимфоидных) клеток крови во взрослом организме. Понимание процессов, приводящих к образованию ГСК в онтогенезе, может существенно облегчить экспериментальные усилия по созданию технологий получения клеток крови *in vitro* для задач регенеративной медицины и онкологии.

В данном обзоре обсуждаются современные гипотезы развития гемопоэтической системы и ГСК в процессе эмбриогенеза, разбирается концепция происхождения кроветворных и эндотелиальных клеток, а также приводится сравнение становления кроветворной системы у мыши и человека.

СПЕЦИАЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК КРОВИ ИЗ РАННЕЙ МЕЗОДЕРМЫ

После открытия ЭСК – плюрипотентных клеток, способных к дифференцировке во все типы клеток, – научным сообществом рассматривается вопрос о возможности получения клеток крови из этого практически неограниченного источника. Ранние работы по направленной дифференцировке клеток крови встретились с серьезным препятствием – невозможностью получения полностью зрелых клеток крови. Так, большинство эритроцитов, полученных из ЭСК человека, содержало ядро и синтезировало фетальный гемоглобин, не способный к эффективному переносу кислорода во взрослом организме [19]. Значительная часть моноцитов демонстрировала незрелый фенотип, макрофаги не могли осуществлять эффективный фагоцитоз и воспалительные реакции [20, 21]. Воспроизводство развития ГСК в пробирке оказалось чрезвычайно трудной экспериментальной задачей. Попытка вызвать увеличение количества ГСК-подобных клеток путем экспрессии гена *НохВ4* выявила их неполную функциональность. Было показано, что такие клетки у мышей склонны к дифференцировке преимущественно в миелоид-

ные предшественники и вносят лишь незначительный вклад в развитие других типов клеток крови [22–24]. Более того, получение ГСК из ЭСК человека требует принудительной экспрессии нескольких транскрипционных факторов одновременно [25, 26].

Таким образом, получение ГСК в культуре *in vitro* без генетических манипуляций до сих пор остается нерешенной задачей.

Сравнение гемопоэза *in vitro* с развитием клеток крови в эмбриогенезе навело на мысль, что протоколы получения ГСК взрослого типа *in vitro*, к сожалению, имитируют лишь примитивную стадию гемопоэза в эмбрионе. Таким образом, исследователи, работающие над созданием эффективной технологии дифференцировки клеток крови из плюрипотентных стволовых клеток были вынуждены обратиться к подробному исследованию эмбрионального развития.

Известно, что сразу после гаструляции клетки эпибласта мыши мигрируют в пространство

между эктодермой и энтодермой, формируя мезодерму (рис. 1, а, з). Дальнейшая специализация приводит к образованию мезодермы латеральной пластинки (МЛП) (рис. 1, б). Именно эту полипотентную ткань считают основой всего гемопоэза в эмбрионе млекопитающих [27]. МЛП характеризуется экспрессией специфического набора генов – *Brachyury (T/TBX1)*, *MIXL1*, *FOXF1*, *APLN*, *HAND1* [26, 28–30], а также *PDGFRa* и *Flk1 (KDR/VEGFR2)* [30, 31]. Формирование мезодермы идет под воздействием факторов, секретирующихся энтодермой, таких как активин, BMP, bFGF и Wnt/ β -катенин. Для дальнейшей дифференцировки в ранний эндотелий и клетки крови критически необходимы Flk1 и его лиганд VEGF [32]. Делеция Flk1 в геноме мыши (*Flk1^{-/-}*) блокирует образование эндотелия и клеток крови [33]. Клетки МЛП мигрируют в желточный мешок, где образуют пояс кровяных островков. Эта самая ранняя зона кроветворения состоит из Flk1⁺VE-кадгерин⁺

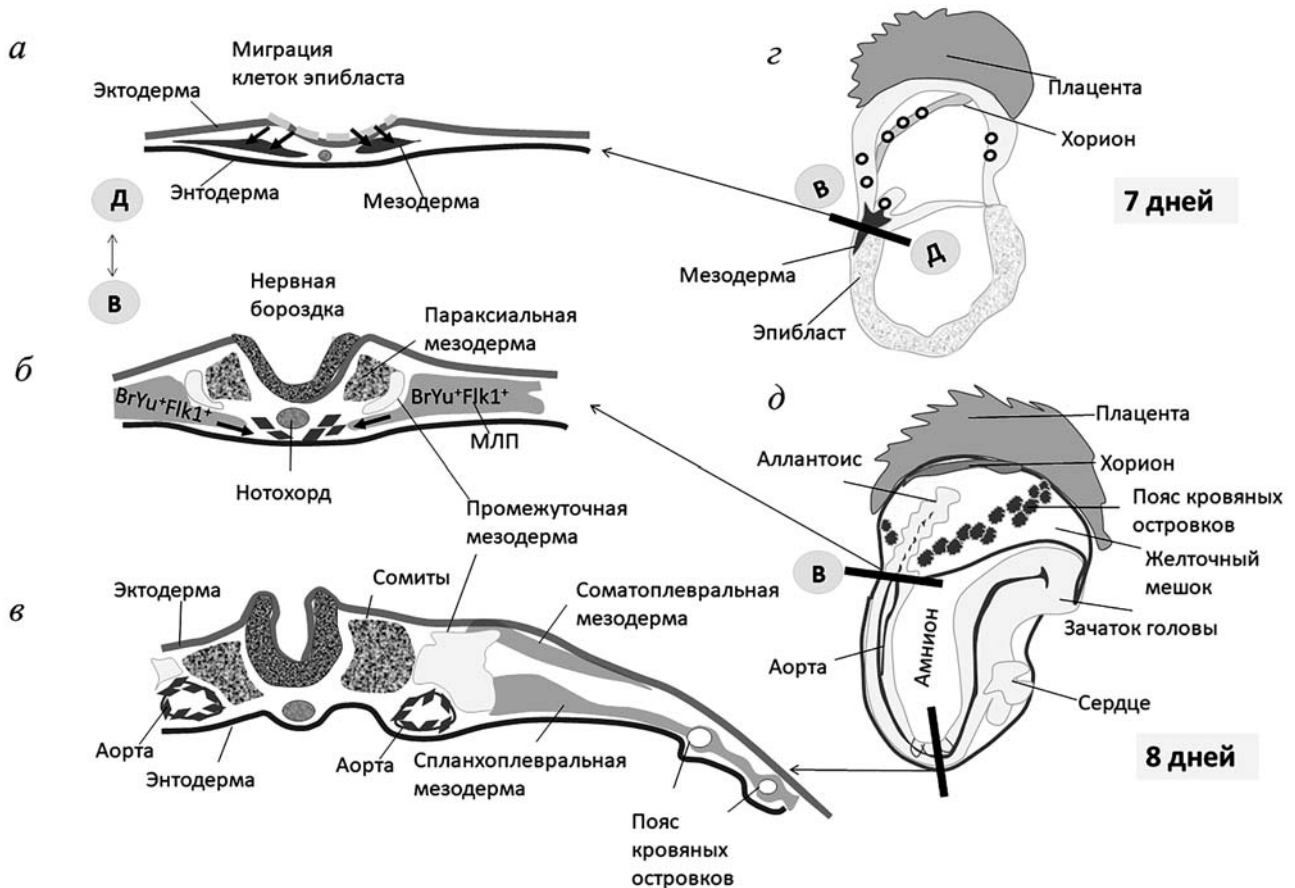


Рис. 1. Развитие эмбриона млекопитающих на примере мыши. а–в – Поперечный срез эмбриона, демонстрирующий трансформацию тканей во время развития; з, д – рисунки эмбрионов мыши с указанием названий тканей и органов. В серых кругах буквами «Д» и «В» обозначены дорзальная и вентральная ориентации эмбриона. Жирными черными линиями показаны места и направление среза ткани; черной и серыми стрелками – дифференцировка и миграция эпибласта в мезодерму (а), дающую эндотелий и примитивную кровь; черными незакрашенными кружочками – расположение примитивной крови (з). Справа указан возраст эмбрионов в днях после фертилизации (7 и 8 дней). МЛП – мезодерма латеральной пластинки

эндотелия и CD41⁺-клеток крови (рис. 1, *з, д*) [34, 35]. За счет дифференцировки и миграции МЛП также идет образование эндотелия дорзальной аорты внутри эмбриона (рис. 1, *б, в*). Однако было показано, что эндотелиальные клетки и клетки крови происходят из разных популяций клеток эпибласта, а значит, возможно, и из разных типов МЛП [36], что может свидетельствовать о разном происхождении структурного эндотелия и клеток примитивной крови. Следующий важный фактор в каскаде развития клеток крови — SCL (Tal1). Он критически необходим для превращения Flk1⁺-клеток в CD41⁺-клетки крови. Если эмбрионы с нокаутом Flk1 не образуют ни крови, ни эндотелия и погибают на 8–9-й день эмбрионального развития мышей [33], то эмбрионы SCL^{-/-} образуют только клетки крови и умирают на 10-й день эмбрионального развития [37, 38]. Анализ транскриптома каждой отдельной клетки химерного эмбриона (в котором присутствовали клетки дикого типа и клетки SCL^{-/-}) показал, что клетки с нокаутом (SCL^{-/-}), в отличие от клеток дикого типа, не развиваются в клетки крови, но формируют нормальный эндотелий [39]. Эти данные свидетельствуют о том, что Flk1 индуцирует дифференцировку общего предшественника эндотелия и клеток крови, однако именно экспрессия SCL критически важна для развития крови [39]. В целом, дифференцировка крови из МЛП находится в динамическом балансе: если Flk1 и SCL ускоряют это развитие, то TGFβ-сигналы играют блокирующую роль [32, 40]. Поэтому часто для направленной дифференцировки кроветворных предшественников на стадии перехода из «мезодермальной» культуры в культуру клеток крови используют химические ингибиторы TGFβ-сигнального пути (например, SB431542, Alk5i) [25, 41].

КОНЦЕПЦИЯ ГЕМОГЕННОГО ЭНДОТЕЛИЯ

На сегодняшний день не вполне ясно, является ли дефинитивный гемопоэз отдельно образующейся линией крови или продолжением примитивного гемопоэза [19, 21, 25, 27]. Так, развитие клеток дефинитивной волны гемопоэза связывают с гемогенным эндотелием (ГЭ). В ходе дифференцировки, по-видимому, в мезодерме, формируется специальный вид пока не идентифицированных эндотелиальных клеток, которые способны производить дефинитивные гематопоэтические клетки (рис. 1, *а, з*) [42, 43]. Такие клетки, скорее всего, присутствуют в желточном мешке на 8-й день развития эмбриона

мышы и в то же время у основания аллантаоиса в каудальной части эмбриона. Опыты по дифференцировке ЭСК в гематопоэтические клетки и прослеживанию их судьбы на уровне отдельных клеток показали образование CD41⁺-клеток из VE-кадгерин⁺CD41⁻CD45⁻-клеток эндотелия [44]. Кроме того, реактивация Runx1 только в эндотелиальных клетках эмбриона (под управлением тканеспецифических промоторов VE-кадгерин-CRE или Tie2-CRE) позволяла восстановить гемопоэз и продукцию ГСК у эмбрионов Runx1^{-/-} [45–47]. Авторы предположили, что Runx1 экспрессируется в «гемогенном эндотелии» и необходим для эндотелиально-гематопоэтического перехода (ЭГП) [42]. Однако широко известно, что и в желточном мешке, и в эмбрионах почти все предшественники крови экспрессируют VE-кадгерин на протяжении их развития (экспрессия начинается со стадии E8,5 и продолжается еще несколько дней после миграции в фетальную печень на 12-й день развития), что не позволяет однозначно сделать вывод о том, на какой стадии развития произошла реактивация Runx1 и восстановление гемопоэза [23, 35, 48–52].

Один из самых ранних гематопоэтических маркеров у мышей — это CD41 (GPII/ITGA2B), отвечающий за адгезию клетки к фибриногену. Присутствие CD41 на поверхности клетки обычно свидетельствует о том, что эта клетка является кроветворной даже в отсутствии других известных гематопоэтических маркеров, таких как CD45 [23, 44, 35, 51–55]. Поверхностный маркер CD41 экспрессируется на дефинитивных гематопоэтических клетках, которые уже прошли ЭГП (рис. 2, *а–е*). Интересно, что реактивация Runx1 под промотором CD41-CRE привела к полному восстановлению гемопоэза, т.е. Runx1 необходим уже после ЭГП. Судя по представленным в этой работе данным, Runx1^{-/-}-клетки крови останавливаются на стадии CD41^{low} и не способны преодолеть этот блок развития и стать CD45⁺-циркулирующими клетками крови. Также среди этих клеток CD41^{low} (Runx1^{-/-}) оказалось меньше апоптотических клеток, чем в аналогичных клетках дикого типа. Это, возможно, свидетельствует об условной «иммортализации» CD41⁺-клеток при делеции Runx1. Задержка клеток в иммортализованном состоянии на стадии CD41⁺ и блок дальнейшего развития повышают риск вторичных мутаций, а значит, и вероятность канцерогенеза, что, возможно, объясняет присутствие мутаций Runx1 при детских лейкозах [56, 57]. В настоящий момент гемогенный эндотелий определяют как промежуточную стадию между мезодермой и клетками крови. Также, возможно, ГЭ способен дифференциро-

ваться как в клетки крови, так и в структурный эндотелий. Такие клетки были описаны при дифференцировке ЭСК и в ранних эмбриональных клетках [44, 58]. В настоящий момент считается, что «гемогенный эндотелий» — это клетки эндотелия с фенотипом $Fli1^{+}CD31^{+}VE$ -кадгерин $^{+}CD45^{-}CD43^{-}$, возможно, $sKit^{+}SCL^{+}$. Вероятно также, что гемогенный эндотелий способен дифференцироваться напрямую в линию предшественников ГСК [53, 59]. Однако ввиду отсутствия прямых методов, позволяющих сортировать клетки гемогенного эндотелия и воспроизводить процесс ЭГП в линию предшественников ГСК и в эндотелий *in vitro*, понятие «гемогенный эндотелий» остается гипотетическим.

ГСК-НЕЗАВИСИМОЕ КРОВЕТВОРЕНИЕ В ЭМБРИОНЕ И ЭКСТРАЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТКАНЯХ

В развитии раннего эмбриона принято выделять три волны гемопоэза [19, 26, 60–64]. Как обсуждалось выше, пока неизвестно, являются ли эти волны независимыми или последовательно переходят одна в другую. Первая волна не дает вклад в кроветворение взрослого организма и лишь временно обеспечивает перенос кислорода примитивными эритроцитами, снабжает тромбоцитами, а также осуществляет контроль за развитием тканей эмбриона и первичную иммунную защиту примитивными макрофагами. Вторая волна гемопоэза в желточном

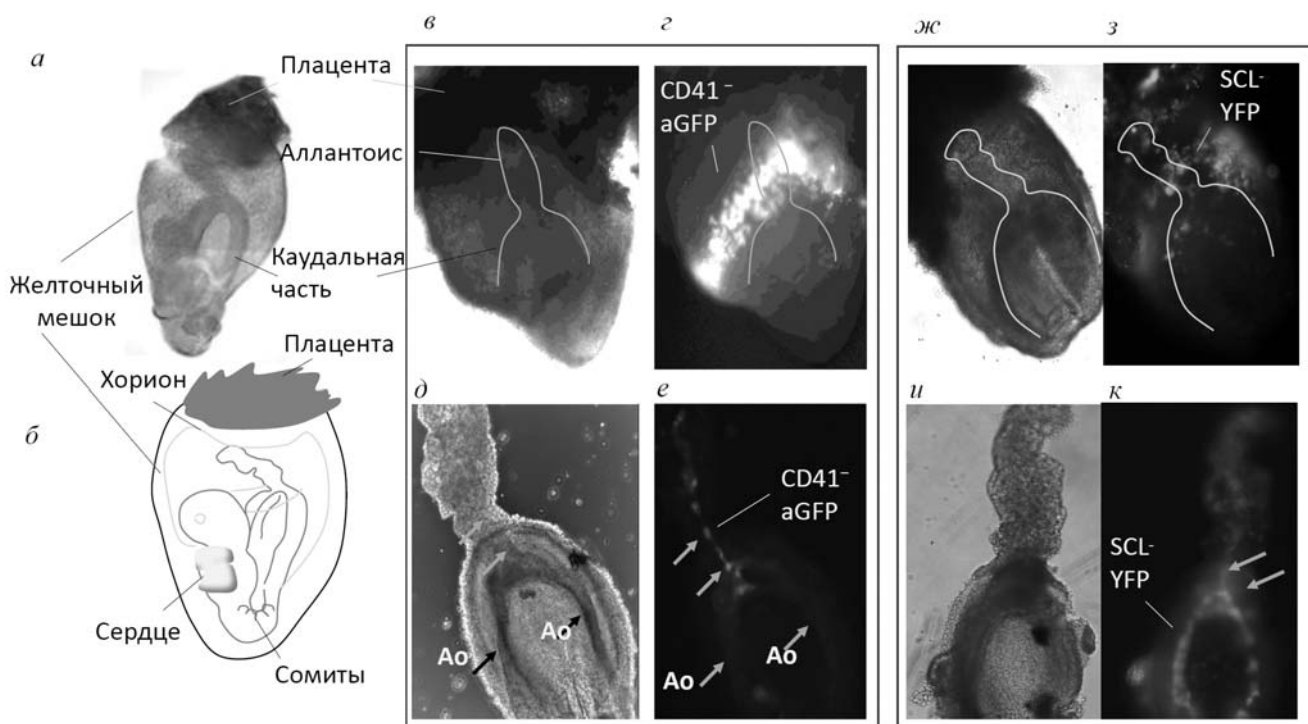


Рис. 2. Образование кроветворных клеток у эмбриона мыши. Мыши, содержащие ген CRE-рекомбиназы под CD41-промотором, были скрещены с мышами, содержащими конструкцию с геном, кодирующим молчаливый зеленый белок GFP, под постоянно работающим промотором (mGFP). После начала экспрессии CD41 в ранних кроветворных клетках происходило LoxP/CRE-зависимое вырезание стоп-кассеты, что приводило к активации зеленого белка (aGFP) у этих клеток и их потомков (CD41⁺aGFP; см. также [54]). *a* — Микрофотография фиксированного и осветленного эмбриона (E8), видна задняя (каудальная) часть эмбриона и аллантоис (для пояснения см. фотографию *б*); *б* — расположение эмбриона в желточном мешке; *в* — фотография целого эмбриона внутри желточного мешка, 8-й день (до начала циркуляции); *г* — микрофотография, демонстрирующая флуоресценцию активированного зеленого белка CD41⁺aGFP в ранних кроветворных клетках того же эмбриона (светлые клетки — пояс кровяных островков); *в, г* — белая линия указывает на расположение каудальной части под желточным мешком; *д* — фотография каудальной части 8-дневного эмбриона; *е* — флуоресцентная фотография CD41⁺aGFP-клеток. Стрелками показана локализация рекомбинированных кроветворных клеток в районе соединения парной дорзальной аорты (Ao) и сосуда аллантоиса; *ж–к* — 8-дневный эмбрион, экспрессирующий SCL-YFP-репортер. Белым цветом и стрелками показаны клетки, экспрессирующие SCL в районе соединения аорты и сосудов аллантоиса. На целом эмбрионе, находящемся в желточном мешке (*ж*), белой линией показано расположение каудальной части, видна нервная бороздка; *з* — флуоресцентная фотография кроветворных клеток, экспрессирующих SCL-YFP в желточном мешке в районе пояса кровяных островков. В каудальной части эмбриона мыши стрелки указывают на клетки, экспрессирующие SCL-YFP-репортер в дорзальной аорте и аллантоисе. До начала циркуляции кроветворные клетки, экспрессирующие SCL (SCL-YFP) и прошедшие стадию CD41 (CD41⁺aGFP), находятся в одном и том же районе у основания аллантоиса (*е, к*) и отдельно от клеток пояса кровяных островков (*г, з*)

мешке также производит транзиторные клетки, служащие для нужд эмбриона. Однако некоторые клеточные популяции второй (дефинитивной) волны остаются в тканях эмбриона и даже продолжают служить во взрослом организме, как предполагается, всю жизнь. Такие клетки заменяются на клетки, происходящие из взрослых ГСК, только в случае восстановления ткани после повреждения. Используемые в литературе понятия «примитивный» и «дефинитивный» гемопоэз во многом условны и четко определены только для развития эритроцитов, т.к. их можно отличить по смене форм гемоглобина [19]. Клетки крови, производящиеся до начала циркуляции, обычно рассматриваются как примитивные и относятся к клеткам первой волны [63]. На стадии E8,25 (4–6 пар сомитов) в эмбрионе мыши запускается сердцебиение, однако циркуляция крови начинается только через несколько часов, после окончательного формирования просвета сосудов [65]. Приблизительно в то же время в желточном мешке появляется $sKit^+CD41^+$ -популяция клеток второй волны гемопоэза (рис. 1, *д*; рис. 2, *г*; рис. 3) [66]. Интересно, что одновременно с этим процессом, до начала сердцебиения и циркуляции, в месте соединения сосудистых структур аллантаиса с парной дорзальной аортой эмбриона тоже появляются $CD41^+$ -клетки (рис. 2, *е*, стрелки), экспрессирующие $sKit$, VE-кадгерин, $Flk1$, $Runx1$ и SCL (см. репортер $SCL-YFP$, рис. 2, *к*) [54]. Там же на стадии E8,5 были обнаружены первые клетки, обладающие лимфоидным потенциалом ($Tie2^+RAG1-CD34^{lo/-}Kit^+CD41^-$) (рис. 3) [50]. Непонятно, дифференцируются ли эти внутриэмбриональные клетки в клетки-предшественники дефинитивных ГСК (относящихся к третьей волне гемопоэза) или это отдельные популяции, служащие для нужд эмбриона и относящиеся ко второй дефинитивной волне гемопоэза. Прямые эксперименты с прослеживанием судьбы отдельных меченых клеток, возможно, смогут ответить на этот важный вопрос. Транзиторный гемопоэз у эмбрионов развивается с нарастанием сложности. Так, у мышей на 9-й день в желточном мешке появляются лимфо-миелоидные предшественники (ЛМПП), которые способны при трансплантации в новорожденных мышей дифференцироваться в В- и Т-клетки, моноциты и гранулоциты [35, 67–70]. В то же время в желточном мешке были фенотипически выявлены первые бипотентные лимфоидные предшественники ($Lin^-Kit^+Rag1GFP^+IL7R\alpha^{+/-}$), которые после миграции в эмбриональную печень дифференцируются в клетки-предшественники Т-клеток ($Lin^-Kit^+Flt3^+IL7R\alpha^+PIR^+$) и В-клеток ($Lin^-Kit^+Flt3^+IL7R\alpha^+PIR^-$) [71, 72]. Возможно, только незна-

чительная часть этих клеток дает вклад во взрослую популяцию Т- и В-клеток. Предшественники В1-клеток ($AA4.1^+CD19^+B220^{-/lo}$) детектируются как в желточном мешке, так и в дорзальной аорте на 9-й день развития эмбриона мышей. Эти клетки способны к репопуляции маргинальных зон лимфатических узлов и селезенки при трансплантации в новорожденных мышей [73, 74]. В 9-дневном желточном мешке были найдены эритромиелоидные предшественники – ЭМП ($sKit^{high}CD41^+CD16/32^+$), способные развиваться в резидентные макрофаги и другие миелоидные клетки. Часть ЭМП (Myb^-) развивается в тканевые макрофаги мозга (клетки микроглии). Другая часть ЭМП (Myb^+) мигрирует в эмбриональную печень, проходя через стадию моноцитов, и развивается в резидентные макрофаги внутри тканей эмбриона (клетки Купфера в фетальной печени и клетки Лангерганса в покровных тканях) [75]. Эти клетки также могут функционировать не только в эмбрионе, но и во взрослом организме [76–78]. ЭМП производят тучные клетки (мастоциты), находящиеся в соединительных тканях. Однако только в жировой ткани и серозной оболочке плевральных полостей тучные клетки эмбрионального происхождения остаются на всю жизнь. В тканях слизистых оболочек они заменяются на клетки, происходящие из ГСК [79, 80]. Тучные клетки кожных покровов также имеют двойное происхождение. Часть из них происходит из взрослого костного мозга, а часть имеет эмбриональное происхождение, причем вторые отличаются по экспрессии генов и могут поддерживать свою популяцию независимо от ГСК [81]. Тем не менее значительность вклада отдельных кроветворных клеток, происходящих из эмбриональных предшественников, и особенности их распределения по тканям и органам позвоночных животных требуют дальнейших исследований.

Данные, полученные в лаборатории профессора Йодера на моделях мышей с инактивацией гена $Ncx1$ ($Ncx1^{-/-}$), показали отсутствие индукции сердцебиения и циркуляции крови (8-й день развития мышей). Такие эмбрионы умирают в течение следующих 24–48 ч. Однако у них обнаружили наличие ЭМП, в основном в желточном мешке и в небольшом количестве в плаценте [82]. Примечательно, что в обоих местах ЭМП возникали автономно. Лишь небольшое количество ЭМП было обнаружено внутри тела эмбриона. Авторы предположили, что в норме появление внутриэмбриональных клеток крови связано с миграцией из желточного мешка через циркуляцию. С учетом факта, что внутриэмбриональный гемопоэз (клетки $CD41^+$ и $Runx1^+$) возникает *in situ* также до начала циркуляции крови и

в месте соединения аллантаоиса с дорзальной аортой внутри эмбриона (рис. 2, e), и в основании аллантаоиса [50, 54, 58], можно предположить, что формирование просвета сосудов и механический стресс от циркуляции крови являются важными факторами для дальнейшего эффективного развития внутриэмбрионального кроветворения [83, 84]. Нельзя также исключить

влияние факторов, секретируемых экстраэмбриональными тканями (ткани желточного мешка и плаценты), на развитие внутриэмбриональных кроветворных предшественников.

Как было сказано выше, эмбриональный гемопоэз развивается с нарастанием полипотентности. Так, клетки первой волны кроветворения в основном являются уни- или бипотентными,

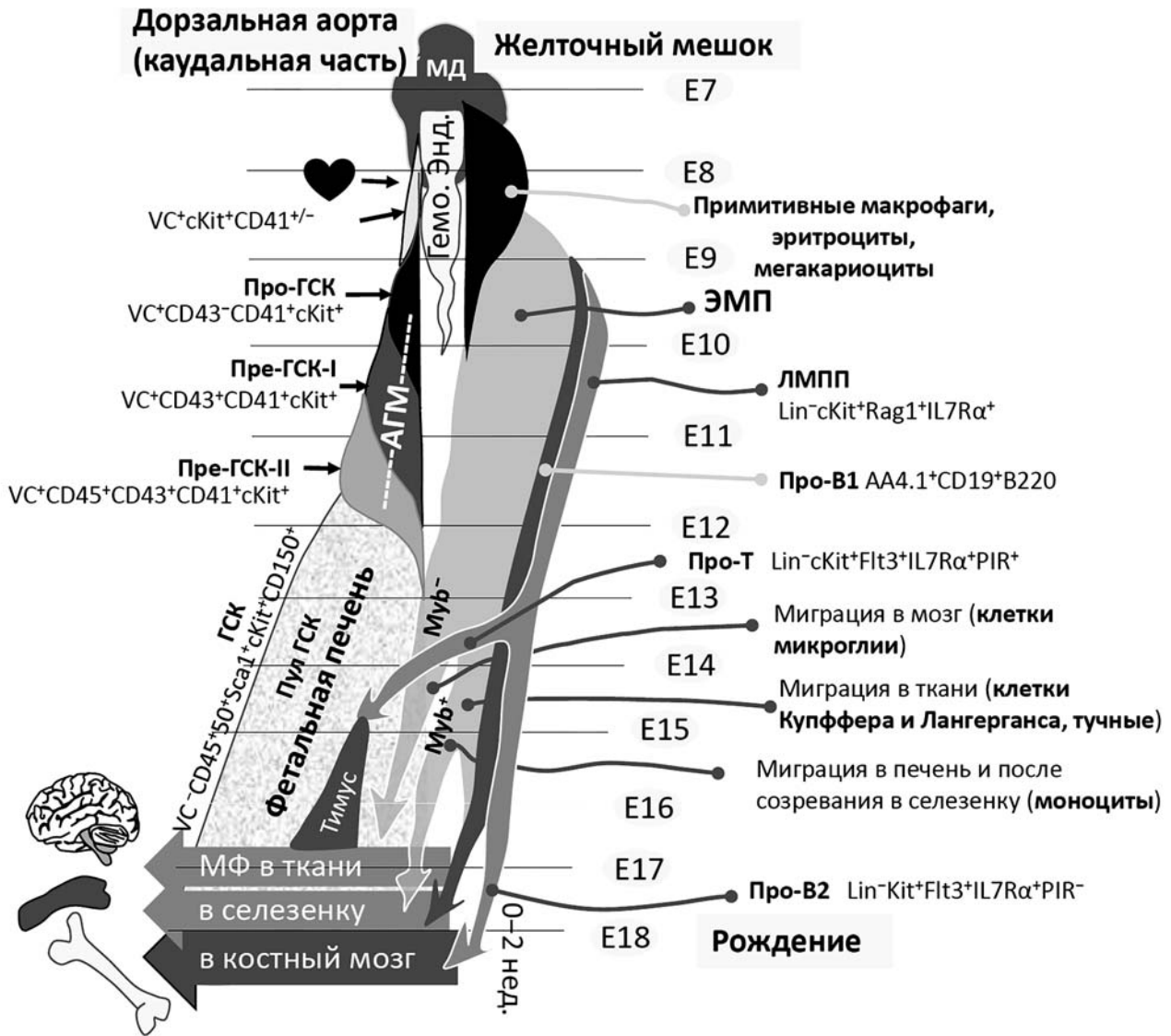


Рис. 3. Вклад эмбрионального гемопоэза в гемопоэтическую систему взрослого организма, клеточная динамика развития гемопоэза (пояснения даны в тексте). Горизонтальными линиями показаны стадии развития эмбрионов, сроки миграций и продолжительность существования тканей (на примере мышцы). Посередине – последовательное развитие мезодермы (МД) и гемогенного эндотелия; слева – развитие дефинитивных предшественников ГСК в тканях эмбриона. Гемопоэз в теле эмбриона (слева сверху вниз) – обозначено появление у основания аллантаоиса на 8-й день развития, до начала циркуляции крови, клеток cKit⁺VE-кадгерин⁺CD41^{+/-} с лимфоидным и миелоидным потенциалами. Знаком сердца изображено начало сердцебиения. Показано последовательное развитие трех предшественников ГСК в АГМ-регионе в 9–11-й дни эмбриогенеза. На 12-й день (слева) отмечена миграция в фетальную печень созревающих ГСК с последующим размножением и миграцией всего пула ГСК в костный мозг. Также обозначено формирование пула ГСК в костном мозге между 16-м днем эмбрионального развития и в течение двух первых недель после рождения (слева внизу). Во внутриэмбриональном кроветворении (слева) отражена только линия ГСК. Желточный мешок (справа сверху вниз). Волны гемопоэза: примитивная (черный цвет) и дефинитивная, дающие вклад во взрослые ткани (серый цвет). Стрелками указано направление миграции различных дефинитивных популяций желточного мешка во взрослые ткани

клетки второй волны, такие как ЛМПП, могут производить лимфоидные и миелоидные линии крови, и только для специального типа предшественников третьей волны гемопоэза (про-ГСК), локализованных в районе дорзальной аорты на 9-й день развития эмбриона мыши, была показана способность созревать в ГСК взрослого типа, которые впоследствии формируют резервный пул стволовых клеток крови в костном мозге взрослых млекопитающих (рис. 3) [35, 53, 85].

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ГСК В ОНТОГЕНЕЗЕ *de novo*

Стволовые клетки взрослого организма поддерживают свой пул в результате редкого симметричного деления (самоподдержания) для компенсации физиологических процессов гемопоэтической системы [86]. ГСК также входят в клеточный цикл при кровопотерях и повреждениях. Однако образование ГСК *de novo* происходит только в результате эмбрионального развития. Поэтому единственным источником знаний, позволяющим понять механизмы процесса возникновения ГСК, остается изучение эмбрионального развития гемопоэтической системы. Предшественники ГСК относятся к третьей, дефинитивной волне эмбрионального гемопоэза, однако до сих пор непонятно, специализируются ли предшественники ГСК отдельно от общего эмбрионального гемопоэза в районе ранней дорзальной аорты из гипотетического гемогенного эндотелия (E8–10) или напрямую из мезодермы. Также возможно, что предшественники ГСК являются естественным продолжением неких кроветворных клеток эмбриона, дифференцировавшихся в раннем гемопоэзе (E7, E8) [60, 87]. Образование предшественников ГСК также связано с транскрипционным фактором Runx1 [55]. Первые клетки, экспрессирующие гематопоэтический транскрипционный фактор Runx1, появляются одновременно в основании аллантаоиса и в желточном мешке [58]. Как было сказано выше, эмбрионы Runx1^{-/-} не способны производить ГСК. Однако остается непонятным, на какой стадии развития Runx1 необходим для спецификации предшественников ГСК. Индуцированная реактивация Runx1 с мечением кроветворных клеток показала, что гемопоэз со значительным вкладом во взрослое кроветворение может быть восстановлен. Примечательно, что участие в образовании взрослых клеток крови прогрессивно нарастало, если реактивацию Runx1 вызывали, начиная с 7-го по 9-й день развития эмбриона мыши, и резко снижалось только в случае реактивации на 10-й

день эмбрионального развития [88–90]. Учитывая, что на 9-й день развития эмбрионов уже появляются первые Runx1⁺-предшественники ГСК в дорзальной аорте, то, по-видимому, инициация развития взрослого пула ГСК происходит между 8-м и 9-м днями эмбрионального развития [53, 85]. Интересно, что начиная с 8-го дня, реактивированные клетки, меченные зеленым белком под промотором Runx1, не образовывали эндотелий сосудов, что ясно свидетельствует о раннем размежевании клеток крови от предшественников структурного эндотелия [88]. Активация GFP под гемопоэтическим промотором (CD41-CRE) позволила проследить появление кроветворных клеток с самого раннего этапа развития. Оказалось, что первые CD41-GFP⁺-клетки появляются на 8-й день в районе соединения парной дорзальной аорты (Ao) с цепью эндотелиальных клеток в аллантаоисе до начала сердцебиения и, значит, до начала миграции клеток крови через циркуляцию (рис. 2, e, стрелки). Нужно отметить, что этот процесс происходит независимо от появления в 7-й и 8-й дни GFP⁺-клеток в районе пояса кровяных островков в желточном мешке (рис. 2, z, z) [54]. Интересно, что клетки как внутри эмбриона, так и в поясе кровяных островков в желточном мешке также экспрессируют SCL (рис. 2, ж–к). Это, возможно, говорит о длительности процесса первичного кроветворения. Дальнейшие исследования показали, что меченые GFP⁺-клетки под промотором CD41 из E11 АГМ-региона являются предшественниками ГСК и могут производить полностью функциональные ГСК *ex vivo*. Напротив, клетки из желточного мешка не способны образовывать ГСК [54]. Аналогичные результаты были получены на клетках дикого типа. Показано, что на 9-й и 10-й дни развития дорзальной аорты АГМ-регион после культивирования способен произвести ГСК, а клетки из желточного мешка или плаценты в это же время не обладают таким потенциалом [53, 85, 91, 92].

Эти данные с высокой вероятностью свидетельствуют о раннем размежевании клеток-предшественников крови и эндотелиальных клеток, а также о независимом происхождении предшественников ГСК внутри эмбриона, отдельно от гемопоэза желточного мешка.

РАЗВИТИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ГСК В РАННЕМ ЭМБРИОНЕ: КЛЕТОЧНАЯ ДИНАМИКА И МИГРАЦИЯ

ГСК взрослого типа способны к репопуляции кроветворной системы взрослых мышей и образуют все линии гемопоэза. Для проверки

этих свойств ГСК человека используют NSG-мышей, у которых отсутствуют лимфоциты, отвечающие за адаптивный иммунный ответ, а также часть врожденного иммунитета (НК-клетки) [18, 93]. Однако незрелые эмбриональные предшественники ГСК не способны к восстановлению кроветворения у облученных мышей [17]. Эти клетки становятся ГСК взрослого типа только после дозревания *ex vivo* или трансплантации в кровяное русло новорожденных мышей, у которых фетальная печень еще некоторое время после рождения способна поддерживать заселение и созревание предшественников ГСК. Однако процесс хоуминга (возвращения в нишу) и дозревания у новорожденных мышей недостаточно эффективен [61, 85, 94]. Именно дозревание *ex vivo* используют для анализа клеточных популяций, способных к производству ГСК взрослого типа. Так, только после дозревания эксплантатов E10 АГМ-региона мышей (не содержащего ГСК) были получены полностью функциональные ГСК взрослого типа [17]. Авторы сделали вывод о производстве ГСК *de novo* внутри АГМ-региона из неизвестных предшественников. В дальнейшем определение набора поверхностных маркеров предшественников ГСК позволило выстроить их иерархию (последовательность развития) и определить количество на каждой стадии до миграции в фетальную печень. Так, с использованием дозревания с последующей прямой трансплантацией или, в других экспериментах, только прямой трансплантации в новорожденных мышей был выявлен фенотип предшественников ГСК [35, 48, 53, 54, 67, 69, 95, 96]. Первый известный на сегодняшний день предшественник ГСК — про-ГСК ($\text{Lin}^- \text{VE-кадгерин}^+ \text{cKit}^+ \text{CD41}^+ \text{CD43}^-$) — впервые детектируется на 9-й день в дорзальной аорте между сердцем и выходом аорты в сторону желточного мешка; пре-ГСК I типа ($\text{Lin}^- \text{VE-кадгерин}^+ \text{cKit}^+ \text{CD41}^+ \text{CD43}^+$) появляются на 10-й день эмбрионального развития, и число таких клеток нарастает от 3–5 до 30–40 клеток за 24 ч. Далее пре-ГСК I типа, увеличивая экспрессию маркера CD45, дифференцируются в пре-ГСК II типа ($\text{Lin}^- \text{VE-кадгерин}^+ \text{cKit}^+ \text{CD41}^+ \text{CD43}^+ \text{CD45}^+$; Lin (lineage) — это термин, означающий отсутствие целого ряда специфических маркеров специализированных клеток крови: CD3, CD4, Gr1, B220, Ter119) (рис. 3). Общее количество предшественников ГСК на 11-й день в АГМ-регионе нарастает за счет дифференцировки пре-ГСК I типа, а также собственного размножения пре-ГСК II типа. Число пре-ГСК достигает ~65 клеток к середине 11-го дня и затем резко снижается. Таким образом, через 24 ч в E12 АГМ-регионе можно детектировать только 5–10 пре-ГСК II типа.

В то же время количество ГСК взрослого типа последовательно нарастает в плаценте и затем в фетальной печени, что свидетельствует о быстрой миграции и созревании в течение последующих 12–24 ч эмбрионального развития [85, 97–99]. Для эмбрионального материала человека (ЭЧМ) не разработано эффективных методов дозревания предшественников ГСК *ex vivo*, так же как и не показано их созревание в фетальной печени новорожденных NSG-мышей. Однако, исходя из оценки набора CD^- -фенотипов клеток в ЭЧМ и при дифференцировке ЭСК *in vitro*, было показано присутствие $\text{VE-кадгерин}^+ \text{CD43}^+ \text{CD45}^-$ клеток, похожих на таковые у мышей и дающих начало клоногенным предшественникам CD45^+ [18, 26, 100–104]. Первые ГСК появляются в ЭЧМ в регионе CS13 (32 д.п.ф) дорзальной аорты ($\text{VE-кадгерин}^+ \text{CD43}^+ \text{CD45}^+$). Эти ГСК обладают экстраординарным пролиферативным потенциалом и способностью к репопуляции: так, одна ГСК, трансплантированная в NSG-мышь-реципиента, дает более 600 ГСК через пять месяцев после трансплантации [100, 101, 104].

Изучение точного фенотипа предшественников ГСК позволяет проследить их развитие во время эмбриогенеза без дорогостоящих экспериментальных трансплантаций, а также осуществлять мониторинг развития ГСК во время разработки протоколов для получения ГСК *in vitro* при направленной дифференцировке ПСК.

В ходе эмбрионального развития предшественники ГСК вступают в периоды деления и пошаговой дифференцировки. Так, было показано, что про-ГСК делятся медленно и находятся в фазе G1/G0 клеточного цикла, в то время как большинство пре-ГСК I типа на 10-й день эмбриогенеза мыши пролиферируют (фаза S/G2/M). Далее на 11-й день, дифференцируясь в пре-ГСК II типа, они продолжают активную пролиферацию, причем небольшая часть пре-ГСК I типа остается недифференцированной, и их пролиферация снижается. После переселения в фетальную печень ГСК взрослого типа постепенно сокращают скорость деления, пока не мигрируют в костный мозг, оставаясь там всю жизнь [105]. Взрослые ГСК переходят в состояние покоя и размножаются медленно (1 раз в 145 дней или ~5 раз в течение жизни мышей) [86]. Постепенно они заполняют все ниши костного мозга, редко мигрируя через кровяное русло в освободившуюся новую нишу. Так, в среднем у мышей во всей крови присутствует как минимум одна ГСК, циркулирующая в течение нескольких секунд до того, как она начинает «роллинг» (интегрин-зависимый процесс замедляющегося перекатывания вдоль эндотелия сосудов с потоком крови), адгезию и проползание через стенки со-

судов в новую нишу [106] (под нишей понимается совокупность клеток, межклеточных взаимодействий, внеклеточного матрикса, сигналов и факторов в гемопоэтических органах, поддерживающих дифференцировку, гомеостаз, миграцию и/или покой пула ГСК). Изучение механизмов мобилизации ГСК из ниши, их миграции и «хоуминга» является исключительно важным для медицинских исследований в области опухолевого метастазирования и патологий гемопоэза.

УЧАСТИЕ КЛЕТОК НИШИ В РАЗВИТИИ И ПОДДЕРЖАНИИ ГСК

Можно условно выделить три типа ниш, в которых происходит развитие ГСК в эмбриогенезе. Первый тип ниши отвечает за *de novo* дифференцировку предшественников ГСК и их первичное размножение [85, 105, 107]. Первый тип ниши локализован в вентральной части дорзальной аорты ориентировочно между 8-м и 10-м днями эмбрионального развития мышей [53, 107–109] и у человека на стадии CS12–17 (26–47 д.п.ф.) в АГМ-регионе [104, 110]. Второй тип ниши ГСК в ходе эмбрионального развития формируется в фетальной печени на 12–16-й дни развития мышей и отвечает за дальнейшее размножение полностью функциональных ГСК [111]. Третий тип ниши в костном мозге позвоночных эволюционно образовался в связи с выходом животных на сушу, по-видимому, для защиты от повреждающего излучения (жесткого ультрафиолета) и от механических повреждений, связанных с гравитацией [112]. Гипоксия во взрослой костномозговой нише также, вероятно, служит для защиты от кислородного стресса, с которым встретились позвоночные при выходе на сушу [113–115]. Ниша костного мозга служит для защиты ГСК от повреждений, содержания в «спящем» состоянии, тонкой регуляции миграции, их дифференцировки в клетки крови и медленного размножения в случае их расходования [116].

В данном обзоре подробно рассматриваются эмбриональные ниши, которые способствуют образованию и первичному размножению ГСК. По нашему убеждению, эти знания наиболее важны для разработки биотехнологических процессов получения и размножения ГСК *in vitro*. Также в обзоре не обсуждаются ниши желточного мешка, т.к. не было показано, что они поддерживают дифференцировку и экспансию предшественников ГСК [26, 60].

Как уже было сказано выше, в дорзальной аорте АГМ-региона (Е9) детектируются первые предшественники, способные к созреванию в

ГСК. Немного позднее (Е11, АГМ) образуются первые ГСК, которые могут дифференцироваться во все типы клеток кроветворной системы взрослого организма [16–18, 48, 53, 54, 108, 117]. Интересно, что даже отдельные стромальные клетки, выделенные из АГМ-региона, могут поддерживать кроветворение [118–122]. Однако только отдельные факторы, секретируемые в АГМ, участвуют в размножении ГСК и их предшественников. Например, даже слабая экспрессия IL-3 в АГМ-регионе Е11 оказывает значительное влияние на размножение поздних предшественников (пре-ГСК II типа) [48, 54, 91, 108, 123]. Делеция IL-3 у мышей приводит к небольшому снижению количества ГСК в АГМ-регионе, возможно, в связи с ожидаемой взаимозаменяемостью некоторых интерлейкинов [123]. Однако в отсутствие SCF (KitL) происходит драматическое снижение количества ГСК в фетальной печени [124]. Показано, что SCF необходим для ранней дифференцировки про-ГСК и размножения пре-ГСК I типа [53, 109]. Разрезание дорзальной аорты на части и проверка способности этих частей производить ГСК показали, что именно в вентральной ее части содержатся ГСК и их предшественники у эмбриона мыши [108, 109] и человека [104]. Секретция клетками вентральной части аорты на 9-й и 10-й дни эмбрионального развития как SCF, так и ингибиторов сигнального пути BMP4 (Noggin, Chordin, BMPER) оказалась также необходимой для развития и размножения предшественников ГСК на самой ранней стадии [53, 85, 107, 109]. Промодестрировано, что для дифференцировки предшественников ГСК необходимо снижение Notch-сигналов в вентральных нишах 10-дневной аорты [125]. Более того, в этот момент факторы, секретируемые дорзальной частью (SHN, VEGF), также важны для размножения и развития предшественников ГСК [109]. В вентральной части АГМ-региона расположены клетки симпатической нервной системы, производящие катехоламины, в синтезе которых в клетках ниши участвует GATA3. Добавление в культуру α - и β -адреногенных агонистов (катехоламинов) позволяло поддержать дифференцировку ГСК даже при дефекте гена *Gata3* в АГМ-регионе [126].

После накопления пула предшественников ГСК в АГМ на 11-й день развития эмбриона мыши начинается процесс миграции в фетальную печень. Этот процесс, по-видимому, зависит от секреции лейкотриена (leukotriene-B4) и интегринов ($\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$) [127–131].

Эмбриональная миграция не исследована в достаточной мере, в отличие от взрослого организма, для которого известно, что мобилизация производится путем прерывания взаимодей-

ствия ГСК с молекулами, представленными в нише. В современной терапии пролиферативных заболеваний принято использовать мобилизованные с помощью Г-КСФ (гранулоцитарного колониестимулирующего фактора) ГСК донора или собственные ГСК пациента. Их запасают, мобилизуют ГСК в циркуляцию из ниши, с последующим их отбором из периферической крови. Г-КСФ активирует нейтрофилы, которые, в свою очередь, выделяют протеазы, разрушающие межклеточные контакты ГСК и клеток ниши. Для мобилизации также используются блокаторы молекул, отвечающих за взаимодействие ГСК с клетками ниши, такие как ингибитор CXCR4 (AMD3100) и блокатор VLA4-VCAM1-зависимой адгезии (BIO4860) [132]. Роль Г-КСФ и данных ингибиторов в миграции из эмбриональных ниш не изучалась. Исследование миграции ГСК из ранней эмбриональной ниши (АГМ) в фетальную печень приведет к более глубокому пониманию этого процесса и, без сомнения, внесет значительный вклад в понимание механизмов патологий кроветворной системы [132].

До сих пор остается невыясненным, где окончательно созревают клетки ГСК в ходе эмбрионального развития. Так, на 11-й день в АГМ-регионе содержится ~60 предшественников ГСК и лишь одна ГСК взрослого типа. Однако уже на следующий день появляется заметное количество ГСК в циркуляции, в плаценте и затем в фетальной печени обнаруживается 50–100 ГСК [85, 133, 134]. По-видимому, предшественники, начиная миграцию с током крови, задерживаются в экстраэмбриональных сосудах, лабиринтах плаценты и созревают во время продвижения к фетальной печени. Предполагается, что лабиринты сосудов плаценты являются промежуточной нишей на пути к месту размножения ГСК в фетальной печени. Далее, располагаясь в районе крупных сосудов фетальной печени в непосредственной близости от нестин⁺NG2⁺-перипитов, ГСК получают как циркулирующие факторы роста, так и факторы от стромальных клеток [135]. В соответствии с этим наблюдением было показано, что SCF⁺DLK⁺-предшественники клеток печени и клетки эндотелия также составляют нишу для ГСК [111, 136]. Дальнейшие исследования клеток ниши в фетальной печени выявили ряд факторов (IGF-2, ATA4, VEGF, ANGPTL3, ANGPTL5, IGFBP2 и др.), значительно ускоряющих размножение как ГСК мыши, так и ГСК из пуповинной крови человека *in vitro* [137–139].

Ниши третьего типа расположены во взрослом костном мозге, и их функции заключаются в поддержании пула ГСК в «спящем» режиме и

регуляции дифференцировки в физиологических условиях, а также в случае повреждений. Выделяют два типа ниш – сосудистые и остеобластные [140]. Циркуляция крови через капилляры и синусы поддерживает гомеостаз ГСК и ниш. Наибольшее количество ГСК локализовано в красном костном мозге губчатых костей и эпифизов конечностей. Однако затруднительно четко разделить сосудистые синусы и остеобластную нишу, которые расположены в непосредственной близости друг от друга. Современные представления о взрослой нише для ГСК связаны с несколькими типами клеток, тесно ассоциированных друг с другом. Они включают в себя эндотелиальные клетки CD31⁺ и/или VE-кадгерин⁺, перипиты нестин⁺NG2⁺, периваскулярные стромальные клетки CD146⁺Sca1⁻LepR⁺, несущие на поверхности мембраносвязанный SCF, CXCL12 и VCAM1 [124, 141]. Эти клетки, известные также как CAR-клетки (CXCL12-abundant reticular), являются бипотентными предшественниками остеобластов и адипоцитов [142].

По-видимому, макрофаги могут индуцировать дифференцировку ГСК в одну или другую линию клеток крови.

Скорее всего, весь процесс покоя, размножения, миграции и дифференцировки ГСК регулируется нервной системой. В частности, эти процессы управляются через секрецию катехоламинов (дофамина, адреналина и норадреналина), которые производятся симпатической нервной системой в ответ на световой цикл или стресс [143–146]. Показано, что шванновские клетки, секретируя TGFβ в ответ на специфические нервные импульсы, также способны напрямую регулировать деление ГСК. Нарушение нормального метаболизма этих факторов влияет на старение клеток ниши и расход пула ГСК [147].

Дальнейшее изучение роли клеток ниши в образовании ГСК *de novo*, их размножении, регуляции покоя, мобилизации, хоуминга и самообновления позволит найти подходы к решению научных и медицинских проблем, связанных с пролиферативными заболеваниями крови, и поможет выявить значение белковых факторов ниши в регенерации ГСК, а также в старении кроветворной и иммунной систем человека.

Данный обзор литературы представляется полезным для понимания особенностей развития гемопоэза в раннем эмбриогенезе млекопитающих. В обзоре акцентировано внимание на различиях в развитии примитивного, транзитного кроветворения эмбриона (происходящего в желточном мешке) и гемопоэза, направленного на формирование зачатка кроветвор-

ной системы взрослого организма. Для этого описано многообразие путей кроветворения в эмбрионе и проанализированы три волны гемопоэза — примитивная, дефинитивная и волна предшественников ГСК, дающих основной вклад в формирование пула ГСК во взрослом костном мозге.

При описании второй дефинитивной волны кроветворения, происходящей преимущественно в желточном мешке, уделено внимание транзиторному кроветворению и образованию клеток-предшественников, участвующих в образовании тканевых макрофагов нервных, соединительных и покровных тканей взрослого организма. Точная идентификация кроветворных клеток эмбриона позволяет понять, как можно проследить развитие линий клеток крови в ходе направленной дифференцировки ГСК из ПСК. Определение регулирования клеточных процессов происхождения и размножения предшественников ГСК дает основу для исследований пролиферативных заболеваний крови и разработки биотехнологических методик по увеличению количества ГСК в донорских образцах, используемых для трансплантаций. Описание происхождения, циклов развития, ниш для размножения, покоя, миграции позволяет выделить специфические клеточные компоненты и их белковые факторы, участвующие в образовании ГСК *de novo*, экспансии и поддержании их

гомеостаза. Дальнейшее изучение процесса дифференцировки ГСК *de novo*, возможно, позволит приблизиться к разработке методов регенерации гемопоэтической системы взрослого организма для восстановления после инфекционных, токсических или лучевых повреждений, а также для коррекции возрастных изменений. Сравнение этапов развития ГСК с лейкоэмическими стволовыми клетками дает возможность лучше понять основы канцерогенеза педиатрических пролиферативных заболеваний.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке РФ (грант № 14-15-00930; Лагарькова М.А.).

Благодарности

Авторы выражают искреннюю благодарность профессору Нине Иосифовне Дризе за ценные замечания и советы, данные при подготовке обзора, и Наталье Рыбцовой за помощь в оформлении.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чертков И.Л., Гуревич О.А. (1984) *Стволовая кроветворная клетка и ее микроокружение*, Медицина, Москва, 238 с.
2. Чертков И.Л., Фриденштейн А.Я. (1977) *Клеточные основы кроветворения (кроветворные клетки-предшественники)*, Медицина, Москва, 272 с.
3. Воробьев А.И., Бриллиант М.Д., Чертков И.Л. (1981) Современная схема кроветворения и возможные мишени гемобластозов, *Тер. архив*, **53**, 9, 3–14.
4. Majeti, R., Park, C.Y., and Weissman, I.L. (2007) Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood, *Cell Stem Cell*, **1**, 6, 635–645, doi: 10.1016/j.stem.2007.10.001.
5. Воробьев А.И., Дризе Н.И., Чертков И.Л. (2006) Схема кроветворения: 2005, *Тер. архив*, **7**, 5–12.
6. Луговская С.А., Почтарь М.Е. (2011) *Гематологический атлас*, 3-е издание, Москва–Тверь, Триада, 368 с.
7. Yamamoto, R., Morita, Y., Ooehara, J., Hamaoka, S., Onodera, M., Rudolph, K.L., Ema, H., and Nakauchi, H. (2013) Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells, *Cell*, **154**, 1112–1126, doi: 10.1016/j.cell.2013.08.007.
8. Notta, F., Zandi, S., Takayama, N., Dobson, S., Gan, O.I., Wilson, G., Kaufmann, K.B., McLeod, J., Laurenti, E., Dunant, C.F., McPherson, J.D., Stein, L.D., Dror, Y., and Dick, J.E. (2016) Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny, *Science*, **351**, aab2116, doi: 10.1126/science.aab2116.
9. Maksimov, A. (1909) Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere, *Folia Haematologica*, Leipzig, Klinghardt, **8**, 125–134.
10. Максимов А. (2009) Лимфоцит как общая стволовая клетка различных элементов крови в эмбриональном развитии и постфетальной жизни млекопитающих, *Клеточная терапия и трансплантация*, **1**, 3, doi: 10.3205/ctt-2009-en-000032.02.
11. Деев Р.В. (2005) Научное наследие Александра Максимова и современность, *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*, **1**, 4–11.
12. Siminovitch, L., McCulloch, E.A., and Till, J.E. (1963) The distribution of colony-forming cells among spleen colonies, *J. Cell Comp. Physiol.*, **62**, 327–336.
13. Becker, A.J., McCulloch, E.A., and Till, J.E. (1963) Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells, *Nature*, **197**, 452–454.
14. Dieterlen-Lievre, F. (1975) On the origin of haemopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **33**, 607–619.
15. Medvinsky, A.L., Samoylina, N.L., Muller, A.M., and Dzierzak, E.A. (1993) An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse, *Nature*, **364**, 64–67, doi: 10.1038/364064a0.
16. Muller, A.M., Medvinsky, A., Strouboulis, J., Grosfeld, F., and Dzierzak, E. (1994) Development of hematopoietic

- stem cell activity in the mouse embryo, *Immunity*, **1**, 291–301.
17. Medvinsky, A., and Dzierzak, E. (1996) Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region, *Cell*, **86**, 897–906.
 18. Ivanovs, A., Rybtsov, S., Welch, L., Anderson, R.A., Turner, M.L., and Medvinsky, A. (2011) Highly potent human hematopoietic stem cells first emerge in the intraembryonic aorta-gonad-mesonephros region, *J. Exp. Med.*, **208**, 2417–2427, doi: 10.1084/jem.20111688.
 19. Baron, M.H. (2013) Concise review: early embryonic erythropoiesis: not so primitive after all, *Stem Cells*, **31**, 849–856, doi: 10.1002/stem.1342.
 20. Zhang, H., and Reilly, M.P. (2017) Human induced pluripotent stem cell-derived macrophages for unraveling human macrophage biology, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **37**, 2000–2006, doi: 10.1161/atvbaha.117.309195.
 21. Yamane, T. (2018) Mouse yolk sac hematopoiesis, *Front. Cell Dev. Biol.*, **6**, 80, doi: 10.3389/fcell.2018.00080.
 22. Antonchuk, J., Sauvageau, G., and Humphries, R.K. (2002) HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells *ex vivo*, *Cell*, **109**, 39–45.
 23. McKinney-Freeman, S.L., Naveiras, O., Yates, F., Loewer, S., Philitas, M., Curran, M., Park, P.J., and Daley, G.Q. (2009) Surface antigen phenotypes of hematopoietic stem cells from embryos and murine embryonic stem cells, *Blood*, **114**, 268–278, doi: 10.1182/blood-2008-12-193888.
 24. Kyba, M., Perlingeiro, R.C., and Daley, G.Q. (2002) HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors, *Cell*, **109**, 29–37.
 25. Blaser, B.W., and Zon, L.I. (2018) Making HSCs *in vitro*: don't forget the hemogenic endothelium, *Blood*, **132**, 1372–1378, doi: 10.1182/blood-2018-04-784140.
 26. Ivanovs, A., Rybtsov, S., Ng, E.S., Stanley, E.G., Elefanty, A.G., and Medvinsky, A. (2017) Human haematopoietic stem cell development: from the embryo to the dish, *Development*, **144**, 2323–2337, doi: 10.1242/dev.134866.
 27. Lugas, J.J., Park, C., Ma, Y.D., and Choi, K. (2009) Both primitive and definitive blood cells are derived from Flk-1⁺ mesoderm, *Blood*, **113**, 563–566, doi: 10.1182/blood-2008-06-162750.
 28. Nostro, M.C., Cheng, X., Keller, G.M., and Gadue, P. (2008) Wnt, activin, and BMP signaling regulate distinct stages in the developmental pathway from embryonic stem cells to blood, *Cell Stem Cell*, **2**, 60–71, doi: 10.1016/j.stem.2007.10.011.
 29. Ditadi, A., Sturgeon, C.M., and Keller, G. (2017) A view of human haematopoietic development from the Petri dish, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 56–67, doi: 10.1038/nrm.2016.127.
 30. Slukvin, I.I., and Kumar, A. (2018) The mesenchymoangioblast, mesodermal precursor for mesenchymal and endothelial cells, *Cell Mol. Life Sci.*, doi: 10.1007/s00018-018-2871-3.
 31. Sakurai, H., Era, T., Jakt, L.M., Okada, M., Nakai, S., and Nishikawa, S. (2006) *In vitro* modeling of paraxial and lateral mesoderm differentiation reveals early reversibility, *Stem Cells*, **24**, 575–586, doi: 10.1634/stemcells.2005-0256.
 32. Park, C., Afrikanova, I., Chung, Y.S., Zhang, W.J., Arentson, E., Fong, G.G., Rosendahl, A., and Choi, K. (2004) A hierarchical order of factors in the generation of FLK1- and SCL-expressing hematopoietic and endothelial progenitors from embryonic stem cells, *Development*, **131**, 2749–2762, doi: 10.1242/dev.01130.
 33. Shalaby, F., Ho, J., Stanford, W.L., Fischer, K.D., Schuh, A.C., Schwartz, L., Bernstein, A., and Rossant, J. (1997) A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis, *Cell*, **89**, 981–990.
 34. Ferkowicz, M.J., and Yoder, M.C. (2005) Blood island formation: longstanding observations and modern interpretations, *Exp. Hematol.*, **33**, 1041–1047, doi: 10.1016/j.exphem.2005.06.006.
 35. Ferkowicz, M.J., Starr, M., Xie, X., Li, W., Johnson, S.A., Shelley, W.C., Morrison, P.R., and Yoder, M.C. (2003) CD41 expression defines the onset of primitive and definitive hematopoiesis in the murine embryo, *Development*, **130**, 4393–4403.
 36. Padron-Barthe, L., Temino, S., Villa del Campo, C., Carramolino, L., Isern, J., and Torres, M. (2014) Clonal analysis identifies hemogenic endothelium as the source of the blood-endothelial common lineage in the mouse embryo, *Blood*, **124**, 2523–2532, doi: 10.1182/blood-2013-12-545939.
 37. Shivdasani, R.A., Mayer, E.L., and Orkin, S.H. (1995) Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncogene tal-1/SCL, *Nature*, **373**, 432–434, doi: 10.1038/373432a0.
 38. Robb, L., Lyons, I., Li, R., Hartley, L., Kontgen, F., Harvey, R.P., Metcalf, D., and Begley, C.G. (1995) Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the *scl* gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 7075–7079.
 39. Scialdone, A., Tanaka, Y., Jawaid, W., Moignard, V., Wilson, N.K., Macaulay, I.C., Marioni, J.C., and Gottgens, B. (2016) Resolving early mesoderm diversification through single-cell expression profiling, *Nature*, **535**, 289–293, doi: 10.1038/nature18633.
 40. Ng, E.S., Azzola, L., Bruveris, F.F., Calvanese, V., Phipson, B., Vlahos, K., Hirst, C., Jokubaitis, V.J., Yu, Q.C., Maksimovic, J., Liebscher, S., Januar, V., Zhang, Z., Williams, B., Conscience, A., Durnall, J., Jackson, S., Costa, M., Elliott, D., Haylock, D.N., Nilsson, S.K., Saffery, R., Schenke-Layland, K., Oshlack, A., Mikkola, H.K., Stanley, E.G., and Elefanty, A.G. (2016) Differentiation of human embryonic stem cells to HOXA⁺ hemogenic vasculature that resembles the aorta-gonad-mesonephros, *Nat. Biotechnol.*, **34**, 1168–1179, doi: 10.1038/nbt.3702.
 41. Kennedy, M., Awong, G., Sturgeon, C.M., Ditadi, A., LaMotte-Mohs, R., Zuniga-Pflucker, J.C., and Keller, G. (2012) T lymphocyte potential marks the emergence of definitive hematopoietic progenitors in human pluripotent stem cell differentiation cultures, *Cell Rep.*, **2**, 1722–1735, doi: 10.1016/j.celrep.2012.11.003.
 42. Gao, L., Tober, J., Gao, P., Chen, C., Zhu, Q., Tan, K., and Speck, N.A. (2018) RUNX1 and the endothelial origin of blood, *Exp. Hematol.*, **68**, 2–9, doi: 10.1016/j.exphem.2018.10.009.
 43. Hirai, H., Ogawa, M., Suzuki, N., Yamamoto, M., Breier, G., Mazda, O., Imanishi, J., and Nishikawa, S. (2003) Hemogenic and nonhemogenic endothelium can be distinguished by the activity of fetal liver kinase (Flk)-1 promoter/enhancer during mouse embryogenesis, *Blood*, **101**, 886–893, doi: 10.1182/blood-2002-02-0655.
 44. Eilken, H.M., Nishikawa, S., and Schroeder, T. (2009) Continuous single-cell imaging of blood generation from haemogenic endothelium, *Nature*, **457**, 896–900, doi: 10.1038/nature07760.
 45. Chen, M.J., Yokomizo, T., Zeigler, B.M., Dzierzak, E., and Speck, N.A. (2009) Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter, *Nature*, **457**, 887–891, doi: 10.1038/nature07619.
 46. Liakhovitskaia, A., Gribi, R., Stamateris, E., Villain, G., Jaffredo, T., Wilkie, R., Gilchrist, D., Yang, J., Ure, J., and Medvinsky, A. (2009) Restoration of Runx1 expression in the Tie2 cell compartment rescues definitive hematopoietic stem cells and extends life of Runx1 knockout animals until birth, *Stem Cells*, **27**, 1616–1624, doi: 10.1002/stem.71.
 47. Li, Z., Chen, M.J., Stacy, T., and Speck, N.A. (2006) Runx1 function in hematopoiesis is required in cells that express Tek, *Blood*, **107**, 106–110, doi: 10.1182/blood-2005-05-1955.

48. Taoudi, S., Gonneau, C., Moore, K., Sheridan, J.M., Blackburn, C.C., Taylor, E., and Medvinsky, A. (2008) Extensive hematopoietic stem cell generation in the AGM region via maturation of VE-cadherin⁺CD45⁺ pre-definitive HSCs, *Cell Stem Cell*, **3**, 99–108, doi: 10.1016/j.stem.2008.06.004.
49. Taoudi, S., Morrison, A.M., Inoue, H., Gribo, R., Ure, J., and Medvinsky, A. (2005) Progressive divergence of definitive haematopoietic stem cells from the endothelial compartment does not depend on contact with the foetal liver, *Development*, **132**, 4179–4191.
50. Yokota, T., Huang, J., Tavian, M., Nagai, Y., Hirose, J., Zuniga-Pflucker, J.C., Peault, B., and Kincade, P.W. (2006) Tracing the first waves of lymphopoiesis in mice, *Development*, **133**, 2041–2051, doi: 10.1242/dev.02349.
51. Boisset, J.C., Clapes, T., Van Der Linden, R., Dzierzak, E., and Robin, C. (2013) Integrin alphaIIb (CD41) plays a role in the maintenance of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryonic aorta, *Biol. Open*, **2**, 525–532, doi: 10.1242/bio.20133715.
52. Bertrand, J.Y., Giroux, S., Golub, R., Klaine, M., Jalil, A., Boucontet, L., Godin, I., and Cumano, A. (2005) Characterization of purified intraembryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin, *PNAS*, **102**, 134–139, doi: 10.1073/pnas.0402270102.
53. Rytbtsov, S., Batsivari, A., Bilotkach, K., Paruzina, D., Senserrich, J., Nerushev, O., and Medvinsky, A. (2014) Tracing the origin of the HSC hierarchy reveals an SCF-dependent, IL-3-independent CD43⁻ embryonic precursor, *Stem Cell Reports*, **3**, 489–501, doi: 10.1016/j.stemcr.2014.07.009.
54. Rytbtsov, S., Sobiesiak, M., Taoudi, S., Souilhol, C., Senserrich, J., Liakhovitskaia, A., Ivanovs, A., Frampton, J., Zhao, S., and Medvinsky, A. (2011) Hierarchical organization and early hematopoietic specification of the developing HSC lineage in the AGM region, *J. Exp. Med.*, **208**, 1305–1315, doi: 10.1084/jem.20102419.
55. Liakhovitskaia, A., Rytbtsov, S., Smith, T., Batsivari, A., Rytbtsova, N., Rode, C., De Bruijn, M., Buchholz, F., Gordon-Keylock, S., Zhao, S., and Medvinsky, A. (2014) Runx1 is required for progression of CD41⁺ embryonic precursors into HSCs but not prior to this, *Development*, **141**, 3319–3323, doi: 10.1242/dev.110841.
56. Nakamura, Y., Ichikawa, M., Oda, H., Yamazaki, I., Sasaki, K., and Mitani, K. (2018) RUNX1-EV11 induces dysplastic hematopoiesis and acute leukemia of the megakaryocytic lineage in mice, *Leuk. Res.*, **74**, 14–20, doi: 10.1016/j.leukres.2018.09.015.
57. Antony-Debre, I., Manchev, V.T., Balayn, N., Bluteau, D., Tomowiak, C., Legrand, C., Langlois, T., Bawa, O., Tosca, L., Tachdjian, G., Leheup, B., Debili, N., Plo, I., Mills, J.A., French, D.L., Weiss, M.J., Solary, E., Favier, R., Vainchenker, W., and Raslova, H. (2015) Level of RUNX1 activity is critical for leukemic predisposition but not for thrombocytopenia, *Blood*, **125**, 930–940, doi: 10.1182/blood-2014-06-585513.
58. Zeigler, B.M., Sugiyama, D., Chen, M., Guo, Y., Downs, K.M., and Speck, N.A. (2006) The allantois and chorion, when isolated before circulation or chorio-allantoic fusion, have hematopoietic potential, *Development*, **133**, 4183–4192, doi: 10.1242/dev.02596.
59. Nishikawa, S.I., Nishikawa, S., Kawamoto, H., Yoshida, H., Kizumoto, M., Kataoka, H., and Katsura, Y. (1998) *In vitro* generation of lymphohematopoietic cells from endothelial cells purified from murine embryos, *Immunity*, **8**, 761–769.
60. Medvinsky, A., Rytbtsov, S., and Taoudi, S. (2011) Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions, *Development*, **138**, 1017–1031, doi: 10.1242/dev.040998.
61. Boisset, J.C., Clapes, T., Klaus, A., Papazian, N., Onderwater, J., Mommaas-Kienhuis, M., Cupedo, T., and Robin, C. (2015) Progressive maturation toward hematopoietic stem cells in the mouse embryo aorta, *Blood*, **125**, 465–469, doi: 10.1182/blood-2014-07-588954.
62. Baron, M.H., Isern, J., and Fraser, S.T. (2012) The embryonic origins of erythropoiesis in mammals, *Blood*, **119**, 4828–4837, doi: 10.1182/blood-2012-01-153486.
63. Lacaud, G., and Kouskoff, V. (2017) Hemangioblast, hemogenic endothelium, and primitive versus definitive hematopoiesis, *Exp. Hematol.*, **49**, 19–24, doi: 10.1016/j.exphem.2016.12.009.
64. Palis, J. (2016) Hematopoietic stem cell-independent hematopoiesis: emergence of erythroid, megakaryocyte, and myeloid potential in the mammalian embryo, *FEBS Lett.*, **590**, 3965–3974, doi: 10.1002/1873-3468.12459.
65. McGrath, K.E., Koniski, A.D., Malik, J., and Palis, J. (2003) Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo, *Blood*, **101**, 1669–1676, doi: 10.1182/blood-2002-08-2531.
66. Palis, J., Robertson, S., Kennedy, M., Wall, C., and Keller, G. (1999) Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse, *Development*, **126**, 5073–5084.
67. Yoder, M.C., Hiatt, K., Dutt, P., Mukherjee, P., Bodine, D.M., and Orlic, D. (1997) Characterization of definitive lymphohematopoietic stem cells in the day 9 murine yolk sac, *Immunity*, **7**, 335–344.
68. Lin, Y., Yoder, M.C., and Yoshimoto, M. (2014) Lymphoid progenitor emergence in the murine embryo and yolk sac precedes stem cell detection, *Stem Cells Dev.*, **23**, 1168–1177, doi: 10.1089/scd.2013.0536.
69. Fraser, S.T., Ogawa, M., Yu, R.T., Nishikawa, S., Yoder, M.C., and Nishikawa, S. (2002) Definitive hematopoietic commitment within the embryonic vascular endothelial-cadherin⁺ population, *Exp. Hematol.*, **30**, 1070–1078.
70. Yoshimoto, M., Porayette, P., Glosson, N.L., Conway, S.J., Carlesso, N., Cardoso, A.A., Kaplan, M.H., and Yoder, M.C. (2012) Autonomous murine T-cell progenitor production in the extra-embryonic yolk sac before HSC emergence, *Blood*, **119**, 5706–5714, doi: 10.1182/blood-2011-12-397489.
71. Masuda, K., Kubagawa, H., Ikawa, T., Chen, C.C., Kakugawa, K., Hattori, M., Kageyama, R., Cooper, M.D., Minato, N., Katsura, Y., and Kawamoto, H. (2005) Prethymic T-cell development defined by the expression of paired immunoglobulin-like receptors, *EMBO J.*, **24**, 4052–4060, doi: 10.1038/sj.emboj.7600878.
72. Boiers, C., Carrelha, J., Lutteropp, M., Luc, S., Green, J.C., Azzone, E., Woll, P.S., Mead, A.J., Hultquist, A., Swiers, G., Perdiguer, E.G., Macaulay, I.C., Melchior, L., Luis, T.C., Kharazi, S., Bouriez-Jones, T., Deng, Q., Ponten, A., Atkinson, D., Jensen, C.T., Sitnicka, E., Geissmann, F., Godin, I., Sandberg, R., de Bruijn, M.F., and Jacobsen, S.E. (2013) Lymphomyeloid contribution of an immune-restricted progenitor emerging prior to definitive hematopoietic stem cells, *Cell Stem Cell*, **13**, 535–548, doi: 10.1016/j.stem.2013.08.012.
73. Yoshimoto, M., Montecino-Rodriguez, E., Ferkowicz, M.J., Porayette, P., Shelley, W.C., Conway, S.J., Dorshkind, K., and Yoder, M.C. (2011) Embryonic day 9 yolk sac and intra-embryonic hemogenic endothelium independently generate a B-1 and marginal zone progenitor lacking B-2 potential, *PNAS*, **108**, 1468–1473, doi: 10.1073/pnas.1015841108.
74. Montecino-Rodriguez, E., and Dorshkind, K. (2012) B-1 B-cell development in the fetus and adult, *Immunity*, **36**, 13–21, doi: 10.1016/j.immuni.2011.11.017.
75. Hoeffel, G., Chen, J., Lavin, Y., Low, D., Almeida, F.F., See, P., Beaudin, A.E., Lum, J., Low, I., Forsberg, E.C., Poidinger, M., Zozzoli, F., Larbi, A., Ng, L.G., Chan, J.K., Greter, M., Becher, B., Samokhvalov, I.M., Merad, M.,

- and Ginhoux, F. (2015) C-Myb⁺ erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages, *Immunity*, **42**, 665–678, doi: 10.1016/j.immuni.2015.03.011.
76. Schulz, C., Gomez, P.E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E., Pollard, J.W., Frampton, J., Liu, K.J., and Geissmann, F. (2012) A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells, *Science*, **336**, 86–90, doi: 10.1126/science.1219179.
 77. Hoeffel, G., and Ginhoux, F. (2018) Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages, *Cell Immunol.*, **330**, 5–15, doi: 10.1016/j.cellimm.2018.01.001.
 78. Ginhoux, F., and Williams, M. (2016) Tissue-resident macrophage ontogeny and homeostasis, *Immunity*, **44**, 439–449, doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.024.
 79. Li, Z., Liu, S., Xu, J., Zhang, X., Han, D., Liu, J., Xia, M., Yi, L., Shen, Q., Xu, S., Lu, L., and Cao, X. (2018) Adult connective tissue-resident mast cells originate from late erythro-myeloid progenitors, *Immunity*, **49**, 640–653, doi: 10.1016/j.immuni.2018.09.023.
 80. Dahlin, J.S., and Hallgren, J. (2015) Mast cell progenitors: origin, development and migration to tissues, *Mol. Immunol.*, **63**, 9–17, doi: 10.1016/j.molimm.2014.01.018.
 81. Gentek, R., Ghigo, C., Hoeffel, G., Bulle, M.J., Msallam, R., Gautier, G., Launay, P., Chen, J., Ginhoux, F., and Bajenoff, M. (2018) Hemogenic endothelial fate mapping reveals dual developmental origin of mast cells, *Immunity*, **48**, 1160–1171, doi: 10.1016/j.immuni.2018.04.025.
 82. Lux, C.T., Yoshimoto, M., McGrath, K., Conway, S.J., Palis, J., and Yoder, M.C. (2008) All primitive and definitive hematopoietic progenitor cells emerging before E10 in the mouse embryo are products of the yolk sac, *Blood*, **111**, 3435–3438, doi: 10.1182/blood-2007-08-107086.
 83. Wolfe, R.P., and Ahsan, T. (2013) Shear stress during early embryonic stem cell differentiation promotes hematopoietic and endothelial phenotypes, *Biotechnol. Bioeng.*, **110**, 1231–1242, doi: 10.1002/bit.24782.
 84. Adamo, L., Naveiras, O., Wenzel, P.L., McKinney-Freeman, S., Mack, P.J., Gracia-Sancho, J., Suchy-Dacey, A., Yoshimoto, M., Lensch, M.W., Yoder, M.C., Garcia-Cardena, G., and Daley, G.Q. (2009) Biomechanical forces promote embryonic haematopoiesis, *Nature*, **459**, 1131–1135, doi: 10.1038/nature08073.
 85. Rybtsov, S., Ivanovs, A., Zhao, S., and Medvinsky, A. (2016) Concealed expansion of immature precursors underpins acute burst of adult HSC activity in foetal liver, *Development*, **143**, 1284–1289, doi: 10.1242/dev.131193.
 86. Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., van der Wath, R.C., Blanco-Bose, W., Jaworski, M., Offner, S., Dunant, C.F., Eshkind, L., Bockamp, E., Lio, P., Macdonald, H.R., and Trumpp, A. (2008) Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair, *Cell*, **135**, 1118–1129.
 87. Dzierzak, E., and Bigas, A. (2018) Blood development: hematopoietic stem cell dependence and independence, *Cell Stem Cell*, **22**, 639–651, doi: 10.1016/j.stem.2018.04.015.
 88. Samokhvalov, I.M., Samokhvalova, N.I., and Nishikawa, S. (2007) Cell tracing shows the contribution of the yolk sac to adult haematopoiesis, *Nature*, **446**, 1056–1061, doi: 10.1038/nature05725.
 89. Samokhvalov, I.M., Thomson, A.M., Lalancette, C., Liakhovitskaia, A., Ure, J., and Medvinsky, A. (2006) Multifunctional reversible knockout/reporter system enabling fully functional reconstitution of the AML1/Runx1 locus and rescue of hematopoiesis, *Genesis*, **44**, 115–121, doi: 10.1002/gene.20190.
 90. Tanaka, Y., Hayashi, M., Kubota, Y., Nagai, H., Sheng, G., Nishikawa, S., and Samokhvalov, I.M. (2012) Early ontogenic origin of the hematopoietic stem cell lineage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 4515–4520, doi: 10.1073/pnas.1115828109.
 91. Gordon-Keylock, S., Sobiesiak, M., Rybtsov, S., Moore, K., and Medvinsky, A. (2013) Mouse extraembryonic arterial vessels harbor precursors capable of maturing into definitive HSCs, *Blood*, **122**, 2338–2345, doi: 10.1182/blood-2012-12-470971.
 92. Cumano, A., Ferraz, J.C., Klaine, M., Di Santo, J.P., and Godin, I. (2001) Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution, *Immunity*, **15**, 477–485.
 93. Shultz, L.D., Lyons, B.L., Burzenski, L.M., Gott, B., Chen, X., Chaleff, S., Kotb, M., Gillies, S.D., King, M., Mangada, J., Greiner, D.L., and Handgretinger, R. (2005) Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid *IL2R γ* ^{null} mice engrafted with mobilized human hematopoietic stem cells, *J. Immunol.*, **174**, 6477–6489.
 94. Arora, N., Wenzel, P.L., McKinney-Freeman, S.L., Ross, S.J., Kim, P.G., Chou, S.S., Yoshimoto, M., Yoder, M.C., and Daley, G.Q. (2014) Effect of developmental stage of HSC and recipient on transplant outcomes, *Dev. Cell*, **29**, 621–628, doi: 10.1016/j.devcel.2014.04.013.
 95. Baumann, C.I., Bailey A.S., Li, W., Ferkowicz, M.J., Yoder, M.C., and Fleming, W.H. (2004) PECAM-1 is expressed on hematopoietic stem cells throughout ontogeny and identifies a population of erythroid progenitors, *Blood*, **104**, 1010–1016, doi: 10.1182/blood-2004-03-09892004-03-0989.
 96. Rybtsov, S., Bilotkach, K., Velasco, J.S., and Medvinsky, A. (2013) Identification of a novel type of immature haematopoietic stem cell (HSC) precursor in mouse development, *FEBS J.*, **280**, 442–443.
 97. Gekas, C., Rhodes, K.E., Van Handel, B., Chhabra, A., Ueno, M., and Mikkola, H.K. (2010) Hematopoietic stem cell development in the placenta, *Int. J. Dev. Biol.*, **54**, 1089–1098, doi: 10.1387/ijdb.103070cg.
 98. Gekas, C., Dieterlen-Lievre, F., Orkin, S.H., and Mikkola, H.K. (2005) The placenta is a niche for hematopoietic stem cells, *Dev. Cell*, **8**, 365–375, doi: 10.1016/j.devcel.2004.12.016.
 99. Ottersbach, K., and Dzierzak, E. (2005) The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region, *Dev. Cell*, **8**, 377–387, doi: 10.1016/j.devcel.2005.02.001.
 100. Ivanovs, A., Rybtsov, S., Anderson, R.A., and Medvinsky, A. (2014) CD43 but not CD41 marks the first hematopoietic stem cells in the human embryo, *Blood*, **124**, 4330.
 101. Ivanovs, A., Rybtsov, S., Welch, L., Anderson, R.A., Turner, M.L., and Medvinsky, A. (2013) Highly potent human haematopoietic stem cells first emerge in the intraembryonic aorta-gonad-mesonephros region, *Lancet*, **381**, 11–12.
 102. Vodyanik, M.A., Thomson, J.A., and Slukvin, I.I. (2006) Leukosialin (CD43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation cultures, *Blood*, **108**, 2095–2105, doi: 10.1182/blood-2006-02-003327.
 103. Kessel, K.U., Bluemke, A., Scholer, H.R., Zaehres, H., Schlenke, P., and Dorn, I. (2017) Emergence of CD43-expressing hematopoietic progenitors from human induced pluripotent stem cells, *Transfus. Med. Hemother.*, **44**, 143–150, doi: 10.1159/000477357.
 104. Ivanovs, A., Rybtsov, S., Anderson, R.A., Turner, M.L., and Medvinsky, A. (2014) Identification of the niche and phenotype of the first human hematopoietic stem cells, *Stem Cell Reports*, **2**, 449–456, doi: 10.1016/j.stemcr.2014.02.004.
 105. Batsivari, A., Rybtsov, S., Souilhol, C., Binagui-Casas, A., Hills, D., Zhao, S., Travers, P., and Medvinsky, A. (2017)

- Understanding hematopoietic stem cell development through functional correlation of their proliferative status with the intra-aortic cluster architecture, *Stem Cell Reports*, **8**, 1549–1562, doi: 10.1016/j.stemcr.2017.04.003.
106. Wright, D.E., Wagers, A.J., Gulati, A.P., Johnson, F.L., and Weissman, I.L. (2001) Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells, *Science*, **294**, 1933–1936, doi: 10.1126/science.1064081.
 107. McGarvey, A.C., Rybtsov, S., Souilhol, C., Tamagno, S., Rice, R., Hills, D., Godwin, D., Rice, D., Tomlinson, S.R., and Medvinsky, A. (2017) A molecular roadmap of the AGM region reveals BMPER as a novel regulator of HSC maturation, *J. Exp. Med.*, **214**, 3731–3751, doi: 10.1084/jem.20162012.
 108. Taoudi, S., and Medvinsky, A. (2007) Functional identification of the hematopoietic stem cell niche in the ventral domain of the embryonic dorsal aorta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 9399–9403, doi: 10.1073/pnas.0700984104.
 109. Souilhol, C., Gonneau, C., Lendinez, J.G., Batsivari, A., Rybtsov, S., Wilson, H., Morgado-Palacin, L., Hills, D., Taoudi, S., Antonchuk, J., Zhao, S., and Medvinsky, A. (2016) Inductive interactions mediated by interplay of asymmetric signalling underlie development of adult haematopoietic stem cells, *Nat. Commun.*, **7**, 10784, doi: 10.1038/ncomms10784.
 110. Gao, X., Xu, C., Asada, N., and Frenette, P.S. (2018) The hematopoietic stem cell niche: from embryo to adult, *Development*, **145**, dev139691, doi: 10.1242/dev.139691.
 111. Chou, S., and Lodish, H.F. (2010) Fetal liver hepatic progenitors are supportive stromal cells for hematopoietic stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 7799–7804, doi: 10.1073/pnas.1003586107.
 112. Kapp, F.G., Perlin, J.R., Hagedorn, E.J., Gansner, J.M., Schwarz, D.E., O'Connell, L.A., Johnson, N.S., Amemiya, C., Fisher, D.E., Wofle, U., Trompouki, E., Niemeyer, C.M., Driever, W., and Zon, L.I. (2018) Protection from UV light is an evolutionarily conserved feature of the haematopoietic niche, *Nature*, **558**, 445–448, doi: 10.1038/s41586-018-0213-0.
 113. Testa, U., Labbaye, C., Castelli, G., and Pelosi, E. (2016) Oxidative stress and hypoxia in normal and leukemic stem cells, *Exp. Hematol.*, **44**, 540–560, doi: 10.1016/j.exphem.2016.04.012.
 114. Suda, T., Takubo, K., and Semenza, G.L. (2011) Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche, *Cell Stem Cell*, **9**, 298–310, doi: 10.1016/j.stem.2011.09.010.
 115. Miharada, K., Karlsson, G., Rehn, M., Rorby, E., Siva, K., Cammenga, J., and Karlsson, S. (2012) Hematopoietic stem cells are regulated by Cripto, as an intermediary of HIF-1 α in the hypoxic bone marrow niche, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1266**, 55–62, doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06564.x.
 116. Wei, Q., and Frenette, P.S. (2018) Niches for hematopoietic stem cells and their progeny, *Immunity*, **48**, 632–648, doi: 10.1016/j.immuni.2018.03.024.
 117. Medvinsky, A.L., Gan, O.I., Semenova, M.L., and Samoylina, N.L. (1996) Development of day-8 colony-forming unit-spleen hematopoietic progenitors during early murine embryogenesis: spatial and temporal mapping, *Blood*, **87**, 557–566.
 118. Durand, C., Robin, C., Bollerot, K., Baron, M.H., Ottersbach, K., and Dzierzak, E. (2007) Embryonic stromal clones reveal developmental regulators of definitive hematopoietic stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 20838–20843, doi: 10.1073/pnas.0706923105.
 119. Durand, C., Robin, C., and Dzierzak, E. (2006) Mesenchymal lineage potentials of aorta-gonad-mesonephros stromal clones, *Haematologica*, **91**, 1172–1179.
 120. Oostendorp, R.A., Robin, C., Steinhoff, C., Marz, S., Brauer, R., Nuber, U.A., Dzierzak, E.A., and Peschel, C. (2005) Long-term maintenance of hematopoietic stem cells does not require contact with embryo-derived stromal cells in cocultures, *Stem Cells*, **23**, 842–851, doi: 10.1634/stemcells.2004-0120.
 121. Oostendorp, R.A., Harvey, K.N., Kusadasi, N., de Bruijn, M.F., Saris, C., Ploemacher, R.E., Medvinsky, A.L., and Dzierzak, E.A. (2002) Stromal cell lines from mouse aorta-gonads-mesonephros subregions are potent supporters of hematopoietic stem cell activity, *Blood*, **99**, 1183–1189.
 122. Buckley, S.M., Ulloa-Montoya, F., Abts, D., Oostendorp, R.A., Dzierzak, E., Ekker, S.C., and Verfaillie, C.M. (2011) Maintenance of HSC by Wnt5a secreting AGM-derived stromal cell line, *Exp. Hematol.*, **39**, 114–123, doi: 10.1016/j.exphem.2010.09.010.
 123. Robin, C., Ottersbach, K., Durand, C., Peeters, M., Vanes, L., Tybulewicz, V., and Dzierzak, E. (2006) An unexpected role for IL-3 in the embryonic development of hematopoietic stem cells, *Dev. Cell*, **11**, 171–180, doi: 10.1016/j.devcel.2006.07.002.
 124. Ding, L., Saunders, T.L., Enikolopov, G., and Morrison, S.J. (2012) Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells, *Nature*, **481**, 457–462, doi: 10.1038/nature10783.
 125. Souilhol, C., Lendinez, J.G., Rybtsov, S., Murphy, F., Wilson, H., Hills, D., Batsivari, A., Binagui-Casas, A., McGarvey, A.C., MacDonald, H.R., Kageyama, R., Siebel, C., Zhao, S., and Medvinsky, A. (2016) Developing HSCs become Notch independent by the end of maturation in the AGM region, *Blood*, **128**, 1567–1577, doi: 10.1182/blood-2016-03-708164.
 126. Fitch, S.R., Kimber, G.M., Wilson, N.K., Parker, A., Mirshekar-Syahkal, B., Gottgens, B., Medvinsky, A., Dzierzak, E., and Ottersbach, K. (2012) Signaling from the sympathetic nervous system regulates hematopoietic stem cell emergence during embryogenesis, *Cell Stem Cell*, **11**, 554–566, doi: 10.1016/j.stem.2012.07.002.
 127. Gribi, R., Hook, L., Ure, J., and Medvinsky, A. (2006) The differentiation programme of embryonic definitive hematopoietic stem cells is largely $\alpha 4$ integrin independent, *Blood*, **108**, 501–509.
 128. Kim, A.G., Vrecenak, J.D., Boelig, M.M., Eissenberg, L., Rettig, M.P., Riley, J.S., Holt, M.S., Conner, M.A., Loukogeorgakis, S.P., Li, H., DiPersio, J.F., Flake, A.W., and Peranteau, W.H. (2016) Enhanced in utero allogeneic engraftment in mice after mobilizing fetal HSCs by $\alpha 4\beta 1/7$ inhibition, *Blood*, **128**, 2457–2461, doi: 10.1182/blood-2016-06-723981.
 129. Hirsch, E., Iglesias, A., Potocnik, A.J., Hartmann, U., and Fassler, R. (1996) Impaired migration but not differentiation of haematopoietic stem cells in the absence of $\beta 1$ integrins, *Nature*, **380**, 171–175, doi: 10.1038/380171a0.
 130. Potocnik, A.J., Brakebusch, C., and Fassler, R. (2000) Fetal and adult hematopoietic stem cells require $\beta 1$ integrin function for colonizing fetal liver, spleen, and bone marrow, *Immunity*, **12**, 653–663, doi: [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80216-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80216-2).
 131. Jiang, X., Hawkins, J.S., Lee, J., Lizama, C.O., Bos, F.L., Zape, J.P., Ghatpande, P., Peng, Y., Louie, J., Lagna, G., Zovein, A.C., and Hata, A. (2017) Let-7 microRNA-dependent control of leukotriene signaling regulates the transition of hematopoietic niche in mice, *Nat. Commun.*, **8**, 128, doi: 10.1038/s41467-017-00137-y.
 132. Ratajczak, M.Z. (2010) Spotlight series on stem cell mobilization: many hands on the ball, but who is the quarterback? *Leukemia*, **24**, 10, 1665–1666, doi: 10.1038/leu.2010.181.
 133. Kumaravelu, P., Hook, L., Morrison, A.M., Ure, J., Zhao, S., Zuyev, S., Ansell, J., and Medvinsky, A. (2002) Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the

- yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver, *Development*, **129**, 4891–4899.
134. Ema, H., and Nakauchi, H. (2000) Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo, *Blood*, **95**, 2284–2288.
 135. Khan, J.A., Mendelson, A., Kunisaki, Y., Birbrair, A., Kou, Y., Arnal-Estape, A., Pinho, S., Ciero, P., Nakahara, F., Ma'ayan, A., Bergman, A., Merad, M., and Frenette, P.S. (2016) Fetal liver hematopoietic stem cell niches associate with portal vessels, *Science*, **351**, 176–180, doi: 10.1126/science.aad0084.
 136. Chou, S., Flygare, J., and Lodish, H.F. (2013) Fetal hepatic progenitors support long-term expansion of hematopoietic stem cells, *Exp. Hematol.*, **41**, 479–490, doi: 10.1016/j.exphem.2013.02.003.
 137. Zhang, C.C., and Lodish, H.F. (2004) Insulin-like growth factor 2 expressed in a novel fetal liver cell population is a growth factor for hematopoietic stem cells, *Blood*, **103**, 2513–2521, doi: 10.1182/blood-2003-08-2955.
 138. Zhang, C.C., Kaba, M., Ge, G., Xie, K., Tong, W., Hug, C., and Lodish, H.F. (2006) Angiopoietin-like proteins stimulate *ex vivo* expansion of hematopoietic stem cells, *Nat. Med.*, **12**, 240–245, doi: 10.1038/nm1342.
 139. Zhao, Y., Zhou, J., Liu, D., Dong, F., Cheng, H., Wang, W., Pang, Y., Wang, Y., Mu, X., Ni, Y., Li, Z., Xu, H., Hao, S., Wang, X., Ma, S., Wang, Q.F., Xiao, G., Yuan, W., Liu, B., and Cheng, T. (2015) ATF4 plays a pivotal role in the development of functional hematopoietic stem cells in mouse fetal liver, *Blood*, **126**, 2383–2391, doi: 10.1182/blood-2015-03-633354.
 140. Taichman, R.S. (2005) Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche, *Blood*, **105**, 2631–2639, doi: 10.1182/blood-2004-06-2480.
 141. Boulais, P.E., and Frenette, P.S. (2015) Making sense of hematopoietic stem cell niches, *Blood*, **125**, 2621–2629, doi: 10.1182/blood-2014-09-570192.
 142. Omatsu, Y., Sugiyama, T., Kohara, H., Kondoh, G., Fujii, N., Kohno, K., and Nagasawa, T. (2010) The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche, *Immunity*, **33**, 387–399, doi: 10.1016/j.immuni.2010.08.017.
 143. Spiegel, A., Shvitiel, S., Kalinkovich, A., Ludin, A., Netzer, N., Goichberg, P., Azaria, Y., Resnick, I., Hardan, I., Ben-Hur, H., Nagler, A., Rubinstein, M., and Lapidot, T. (2007) Catecholaminergic neurotransmitters regulate migration and repopulation of immature human CD34⁺ cells through Wnt signaling, *Nat. Immunol.*, **8**, 1123–1131, doi: 10.1038/ni1509.
 144. Garcia-Garcia, A., Korn, C., Garcia-Fernandez, M., Domingues, O., Villadiego, J., Martin-Perez, D., Isern, J., Bejarano-Garcia, J.A., Zimmer, J., Perez-Simon, J.A., Toledo-Aral, J.J., Michel, T., Airaksinen, M.S., and Mendez-Ferrer, S. (2018) Dual cholinergic signals regulate daily migration of hematopoietic stem cells and leukocytes, *Blood*, doi: 10.1182/blood-2018-08-867648.
 145. Pierce, H., Zhang, D., Magnon, C., Lucas, D., Christin, J.R., Huggins, M., Schwartz, G.J., and Frenette, P.S. (2017) Cholinergic signals from the CNS regulate G-CSF-mediated HSC mobilization from bone marrow via a glucocorticoid signaling relay, *Cell Stem Cell*, **20**, 648–658, doi: 10.1016/j.stem.2017.01.002.
 146. Mendez-Ferrer, S., Lucas, D., Battista, M., and Frenette, P.S. (2008) Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations, *Nature*, **452**, 442–447, doi: 10.1038/nature06685.
 147. Maryanovich, M., Zahalka, A.H., Pierce, H., Pinho, S., Nakahara, F., Asada, N., Wei, Q., Wang, X., Ciero, P., Xu, J., Leftin, A., and Frenette, P.S. (2018) Adrenergic nerve degeneration in bone marrow drives aging of the hematopoietic stem cell niche, *Nat. Med.*, **24**, 782–791, doi: 10.1038/s41591-018-0030-x.

DEVELOPMENT OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS IN THE EARLY MAMMALIAN EMBRYO

S. A. Rybtsov^{1*} and M. A. Lagarkova²

¹ MRC Centre for Regenerative Medicine, University of Edinburgh, EH16 4U, Edinburgh, United Kingdom; E-mail: srybtsov@ed.ac.uk

² Federal Research and Clinical Centre of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical-Biological Agency, 119435 Moscow, Russia; E-mail: lagar@rcpcm.org

Received November 20, 2018

Revised December 4, 2018

Accepted December 4, 2018

Hematopoietic stem cells (HSCs) were first stem cells discovered in human. A.A. Maximov proposed an idea of blood stem cell which was confirmed later by McCulloch and Till experimentally. HSCs were the first type of stem cells to be used in clinic and ever since are being continually used. Indeed, single HSC transplanted intravenously is capable to give rise to all types of blood cells. Last decades, human and animal HSC origin, development, hierarchy and gene signature have been extensively investigated. Due to the constant need for donor blood and HSCs suitable for therapeutic transplants, the experimental possibility of obtaining HSCs *in vitro* by directed differentiation of pluripotent stem cells (PSCs) has been considered in recent years. However, despite all efforts, it is not yet possible to reproduce *in vitro* the ontogenesis of HSCs and obtain cells capable of long-term maintenance of hematopoiesis. The study of hematopoiesis in embryonic development facilitates the establishment and improvement of protocols for deriving blood cells from the PSCs and allows a better understanding of the pathogenesis of various types of proliferative blood diseases, anemia and immunodeficiency. The review is focused on the development of hematopoiesis in mammalian ontogenesis.

Keywords: hematopoietic stem cells (HSC), hematopoietic progenitors, hematopoietic hierarchy, mouse development, human haematopoiesis, AGM, embryo