

УДК 576.53, 57.085.23

ГЕМОПОЭТИЧЕСКАЯ СТВОЛОВАЯ КЛЕТКА И НАЧАЛЬНЫЕ СТАДИИ ГЕМОПОЭЗА: МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ

© 2022 г. О. Н. Шевелева^а *, И. В. Лядова^а

^аИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

*e-mail: on_sheveleva@mail.ru

Поступила в редакцию 14.06.2022 г.

После доработки 15.08.2022 г.

Принята к публикации 17.08.2022 г.

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) долгое время оставались одними из самых хорошо изученных стволовых клеток. Многочисленные экспериментальные и клинические исследования позволили охарактеризовать основные свойства ГСК, разработать методические подходы к их анализу и в конечном итоге привели к формированию иерархической теории кроветворения. Согласно иерархической теории кроветворения ГСК рассматриваются как основа разветвленного дерева кроветворных предшественников, в процессе дифференцировки которых теряется способность клеток к самообновлению (т.е. к поддержанию собственной популяции), происходит переход от мультипотентности к олиго- и унипотентности и образуются дифференцированные клетки крови различной линейной принадлежности. Во многом благодаря разработке и внедрению новых высокотехнологичных методов анализа дифференцировки клеток, представления о строгой последовательности дифференцировки ГСК в последнее время изменились. В частности, получены доказательства гетерогенности и частичной коммитированности ГСК, новые данные о взаимоотношениях между отдельными популяциями мультипотентных предшественников, значительно расширены представления о молекулярных механизмах, обеспечивающих поддержание и дифференцировку ГСК. Настоящий обзор посвящен рассмотрению основных характеристик ГСК, методических подходов, используемых для их изучения и рассмотрению современных взглядов на ранние стадии гемопоэза.

Ключевые слова: гемопоэтические стволовые клетки, гемопоэз, гетерогенность, иерархия

DOI: 10.31857/S0475145022060076

ВВЕДЕНИЕ

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) – тканеспецифичные стволовые клетки, характеризующиеся способностью дифференцироваться во все типы клеток крови – эритроциты, тромбоциты, лейкоциты. Процесс образования клеток крови из относительно небольшого числа гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток (ГСПК) называется гемопоэзом. Как и для других стволовых клеток, основными характеристиками ГСК являются способность к самообновлению и способность давать начало разным типам клеток (мультипотентность) (Гордеев и др., 2021). Отличительной характеристикой ГСПК является интенсивность процесса образования из них дифференцированных клеток: по последним оценкам в сутки в организме человека образуется $0.33 \pm 0.02 \times 10^{12}$ клеток, из которых более 85% составляют клетки крови (Sender, Milo, 2021). Сочетание указанных характеристик обуславливает высокую репопулирующую способность ГСК

(т.е. способность восстанавливать гемопоэз после трансплантации реципиенту) и высокий клинический потенциал их применения.

Долгое время считалось, что гемопоэз достаточно хорошо изучен. Существовала детальная общепринятая иерархическая модель гемопоэза, в которой каждая отдельная популяция кроветворных предшественников была функционально и фенотипически охарактеризована (рис. 1-Г). Однако в последнее десятилетие, во многом благодаря появлению технологий анализа на уровне единичных клеток, устоявшиеся взгляды на пути дифференцировки и однородность клеток внутри популяций ГСК и ГСПК стали меняться. Во многих исследованиях была показана гетерогенность считавшейся ранее однородной популяции ГСК (Paul et al., 2015; Naas et al., 2018; Zhang et al., 2022). При этом применение ГСК в клинической практике требует понимания биологии этих клеток, механизмов их образования, поддержания и дифференцировки, наличия и совершенствования методов их идентификации и выделения. В

настоящее время основные проблемы в исследовании ГСК связаны с их распознаванием и изоляцией, поиском подходов к их изучению, не приводящих к получению артефактов, идентификацией молекулярных регуляторов, связанных с их функционированием, и соотносением новых данных с принятой парадигмой. Настоящий обзор посвящен рассмотрению биологии ГСК, методических подходов, используемых для их изучения и рассмотрению современных взглядов на ранние стадии гемопоэза.

ОБРАЗОВАНИЕ ГСК В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ

Представления о становлении гемопоэза и образовании ГСК в эмбриогенезе основаны, главным образом, на экспериментальных исследованиях на мышах. В эмбриогенезе кроветворение устанавливается в три этапа, которые называют «волнами» гемопоэза – примитивный гемопоэз, прединитивный и дефинитивный (Dzierzak et al., 2018). Примитивный гемопоэз происходит внеэмбрионально в желточном мешке (начиная со стадии E7.0–E7.5 у мышей и на 16–18.5 сут после оплодотворения у человека) и характеризуется образованием примитивных эритроидных клеток, содержащих крупные ядра и эмбриональный гемоглобин, мегакариоцитов, отличающихся от взрослых мегакариоцитов размером и полиплоидией, и эмбриональных макрофагов (Kennedy et al., 2007; Sanu et al., 2021). В настоящее время единой точки зрения о природе предшественника этих клеток нет. Среди возможных источников этих клеток называют гемангиобласт (клетка-предшественник, обладающая как гемопоэтическим, так и эндотелиальным потенциалом), гемогенный эндотелий (эндотелий, обладающий способностью давать начало гемопоэтическим клеткам) или непосредственно клетки мезодермы (Lacaud, Kouskoff, 2017; Wittamer, Bertrand, 2020). На стадии прединитивного гемопоэза, происходящей также в желточном мешке, образуется гемогенный эндотелий, а из него – единый эритромиелоидный предшественник (ЕМР), дающий начало эритроидным клеткам, мигрирующим в фетальную печень, мегакариоцитам и макрофагам (начиная со стадии E8.25 у мышей и на 28–35 сут после оплодотворения у человека). Помимо ЕМР, на этой стадии образуется лимфоидный предшественник, способный давать начало В-лимфоцитам (Palis et al., 2001; McGrath et al., 2015; Wittamer, Bertrand, 2020). ГСК как единая клетка-предшественник, способная давать начало всем линиям клеток крови, на данной стадии эмбрионального развития еще отсутствует. ГСК образуются в третью волну гемопоэза (начиная со стадии E10.5 для мыши, 26–42 сут после оплодотворения для человека) из гемогенного эндотелия в области аорто-гонадо-мезонефроса (АГМ) в результате эндотелиально-крово-

творного перехода (Medvinsky et al., 2011). Клетки этой области постепенно теряют эндотелиальные характеристики и приобретают фенотип и морфологию ГСК (Lange et al., 2021). Происхождение ГСК именно из эндотелиальных клеток дорсальной аорты, входящей в состав АГМ, а не из лежащей в его основе мезенхимы, было убедительно показано с помощью покадровой визуализации под конфокальным микроскопом и внесения генетической метки в эндотелиальные клетки с использованием мышей с репортерным геном LacZ (Zovein et al., 2008; Boisset et al., 2010). ГСК АГМ неспособны к дифференцировке *in situ*. При этом способность к самообновлению у зародышевых ГСК существенно превышает такую способность у ГСК из костного мозга взрослых особей (Ivanovs et al., 2011). Помимо АГМ в зародыше существуют и другие области, по-видимому, способные генерировать ГСК – это желточные и пуповинные артерии, плацента и голова зародыша (Marella et al., 2000; Gekas et al., 2005; Ivanovs et al.; 2011; Li et al., 2012). Как соотносятся между собой ГСК из разных областей зародыша еще предстоит выяснить. Для дифференцировки ГСК необходима их миграция из области АГМ в печень плода, где происходит экспансия и образование кроветворных предшественников (Godin et al., 1999; Ema et al., 2000). Миграция в эмбриональную печень происходит начиная с 11-го дня развития у мыши и 28-го дня развития у человека. После колонизации печени ГСПК мигрируют в тимус и селезенку (стадия E11–12), а затем, незадолго до рождения ГСК из фетальной печени заселяют костный мозг (Mazo et al., 2011). Одна из функций костномозгового микроокружения, ниши, заключается в поддержании пула ГСК в состоянии покоя. Таким образом происходит становление постнатального гемопоэза.

ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА ГСК И ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ИЕРАРХИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ ГЕМОПОЭЗА

Положение о существовании единой стволовой кроветворной клетки, дающей начало всем кроветворным клеткам, берет свое начало из работ А.А. Максимова и его унитарной теории кроветворения (Maximow et al., 1924). В настоящее время ГСК считаются одними из самых хорошо охарактеризованных тканеспецифических стволовых клеток.

Основными свойствами ГСК являются способность длительное время находиться в покоящемся состоянии, способность к самоподдержанию (самообновлению), дифференцировке в различные клеточные типы (мультипотентность), а также способность к мобилизации для пополнения пула кроветворных клеток в условиях стресса. Эти свойства позволяют ГСК постоянно поддер-

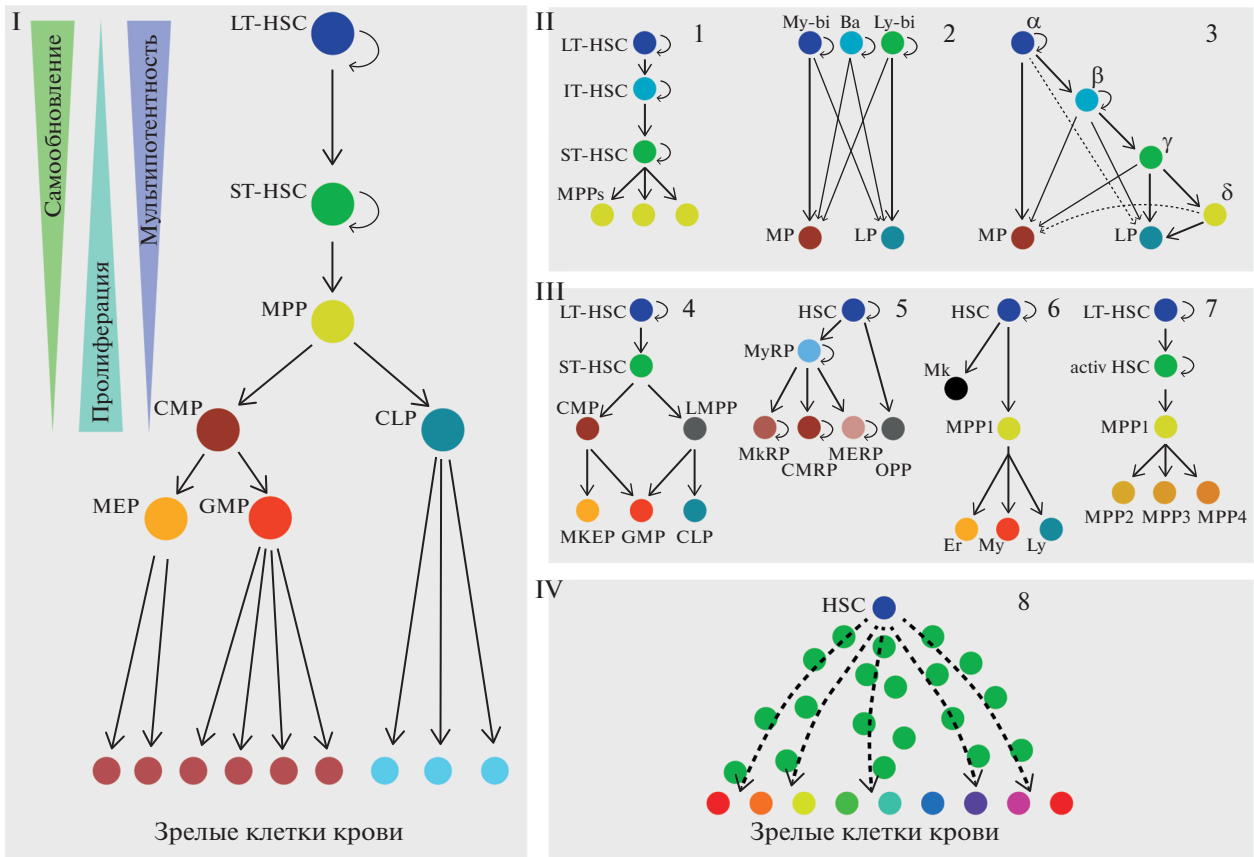


Рис. 1. Изменение представлений о кроветворении и модели гемопоэза. I – Иерархическая модель гемопоэза. Дискретные популяции, ступенчатая дифференцировка. LT-HSC дифференцируются в ST-HSC, которые дифференцируются в MPP. Первая точка бифуркации происходит при дифференцировке MPP по двум возможным направлениям – CMP и CLP. По ходу дифференцировки кроветворных предшественников снижается способность к самообновлению и дифференцировочные потенции, усиливается пролиферативная активность. II – Появление первых данных о гетерогенности ГСК. 1 – Классическая модель гемопоэза с введением промежуточной популяции ГСК (IT-HSC) (Benveniste et al., 2010). 2 – “My-Bi и Ly-Bi” модель, в которой демонстрируется присутствие трех разных популяций ГСК, прекоммитированных к дифференцировке в большей степени в миелоидном направлении (My-bi), в лимфоидном (Ly-Bi) и “сбалансированные” ГСК (Ba) (Muller-Sieburg et al., 2002). 3 – Модель “α, β, γ, δ” ГСК, демонстрирующая присутствие четырех разных популяций ГСК, отличающихся по своим дифференцировочным потенциям, коммитированности к дифференцировке по лимфоидному или миелоидному пути и способностям к самообновлению (Dykstra et al., 2007). III – Изменение представлений о точках бифуркации в раннем гемопоэзе и мультипотентных кроветворных предшественниках. 4 – Идентификация нового предшественника – LMPP, который утрачивает способность дифференцироваться в мегакариоцитарно-эритроидном направлении (Adolfsson et al., 2005). 5 – Модель “миелоидного шунтирования”, показывающая ранее ответвление миелоидно-ограниченных репопулирующих предшественников (Yamamoto et al., 2013). 6 – Модель, демонстрирующая ранее ответвление мегакариоцитарного предшественника (Notta et al. 2016). 7 – Модель гетерогенности популяции MPP. MPP подразделены на MPP1-, 2-, 3-, 4-. MPP1 дает начало всем линиям, MPP2/3 коммитированы в миелоидном направлении, а MPP4 – в лимфоидном (Pietras et al., 2015). IV (8) – Модель непрерывной дифференцировки, “континуума кроветворных стволовых клеток и клеток-предшественников”. Дискретные популяции отсутствуют, кроветворные предшественники постепенно приобретают коммитированность к дифференцировке в определенном направлении (Quesenberry et al., 2017; Velten et al., 2017; Cheng et al., 2020). LT-HSC – длительно репопулирующие ГСК, ST-HSC – коротко репопулирующие ГСК, IT-HSC – промежуточные ГСК, MPP – мультипотентные предшественники, CMP – общие миелоидные предшественники, CLP – общие лимфоидные предшественники, MEP – мегакариоцитарно-эритроидные предшественники, GMP – гранулоцитомоноцитарные предшественники, My-bi – миелоид-смещенные ГСК, Ba – сбалансированные ГСК, Ly-bi – лимфоид-смещенные ГСК, MP – миелоидные предшественники, LP – лимфоидные предшественники, LMPP – лимфоид-праймированные мультипотентные предшественники, MKEP – мегакариоцитарно-эритроидные предшественники, MyRP – миелоидно-ограниченные репопулирующие предшественники, MkRP – репопулирующие предшественники мегакариоцитов, CMRP – репопулирующие предшественники миелоидных клеток, MERP – мегакариоцитарно-эритроидные репопулирующие предшественники, OPP – олигопотентные предшественники, олиго- и унипотентные предшественники мегакариоцитов (Mk), эритроцитов (Er), клеток миелоидной (My) и лимфоидной (Ly) линий. Круглыми стрелками показана способность к самообновлению.

живать кроветворение и восстанавливать его после трансплантации. Важно отметить, что “умение” ГСК одновременно восполнять собственную популяцию и дифференцироваться, давая разные типы клеток, характерное для стволовых клеток, обеспечивается их способностью к асимметричному делению (Терских и др., 2007). В процессе гемопоэза, по мере дифференцировки ГСК, у клеток исчезает способность к самообновлению, увеличивается пролиферативная активность, происходит переход от мульти- к олиго- и унипотентности, что приводит к снижению (исчезновению) репопулирующей способности. Указанные изменения сопровождаются изменением эпигенома, транскриптомного и протеомного профилей клеток, а также поверхностного фенотипа клетки.

Изучение ГСК на мышинных моделях привело к созданию иерархической модели кроветворения, выделению и детальной характеристике различных популяций кроветворных клеток. Классическая иерархическая модель, общепринятая до недавнего времени, представляет гемопоэз, как пошаговый процесс перехода от ГСК и мультипотентных предшественников к олиго- и унипотентным предшественникам и, наконец, к зрелым клеткам крови (рис. 1-1). Обычно схему гемопоэза представляют в виде разветвленного дерева, на вершине которого находятся длительно репопулирующие ГСК (LT-HSCs), характеризующиеся высокой способностью к самообновлению и долгосрочному (не менее 16 недель) восстановлению кроветворения при трансплантациях, далее следуют коротко репопулирующие ГСК (ST-HSCs), обладающие ограниченными способностями к самообновлению и восстановлению кроветворения (как правило, меньше, чем на 4 нед.) и затем — мультипотентные предшественники (MPP), не обладающие способностью к самообновлению и восстановлению кроветворения после трансплантации летально облученным животным (Bryder et al., 2006; Challen et al., 2010). Некоторые авторы, учитывая разную динамику восстановления миелоидных и лимфоидных клонов после трансплантации, предлагают анализировать периферическую кровь реципиентов трижды, например, через 1–2, 4–6 и 8–12 мес. после трансплантации или через 1–2 и 4–6 мес. после первичной трансплантации и через 4–6 мес. после вторичной. В этом случае LT-HSCs определяются как ГСК, поддерживающие восстановление гранулоцитов от 2 до 12 мес. и более, ST-HSCs — до 2-х мес. после трансплантации (как обсуждается ниже, клетки, поддерживающие кроветворение до 8 мес., относят к отдельной популяции “промежуточных” ГСК (intermediate-term HSCs, IT-HSC) (Ema et al., 2014). В ряду LT-HSCs → ST-HSCs → MPPs наблюдается снижение способности к репопуляции и повышение пролиферативного потенциала. От MPPs начинаются разветвления (бифуркации) и

снижение дифференцировочных потенциалов клеток (Doulatov et al., 2012). MPPs дают олигопотентные общие миелоидные предшественники (CMPs) и общие лимфоидные предшественники (CLPs) (табл. 1, рис. 1-1). В последние годы с появлением новых методов исследований происходит пересмотр “классической” иерархической модели.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ГСК

Существует несколько методических подходов к исследованию ГСК. Основными являются — клональный анализ, проточная цитометрия, трансплантация, в последние годы — анализ на уровне единичных клеток (single-cell). Поскольку для обеспечения кроветворения и для клинического применения ГСК репопулирующая способность является ключевой, ее оценке уделяется наибольшее внимание исследователей.

Клональный анализ

Одним из самых первых методов анализа ГСК стал клональный анализ. В его основу легли эксперименты Тилла и Мак Куллоха, в которых было показано образование колоний разного типа кроветворных клеток в селезенке летально облученных мышей-реципиентов при трансплантации им клеток сингенного костного мозга. Мультипотентные предшественники, дающие начало разным типам кроветворных клеток, были названы авторами КОЕ-С (колониеобразующие единицы селезенки) (Till and McCulloch, 1961). По мере развития методов культивирования ГСК, клональный анализ стал проводиться и в системах *in vitro*. Для получения культур кроветворных клеток *in vitro* были разработаны методы культивирования на агаровом покрытии и фидерном слое из клеток периферической крови, что позволяло стимулировать образование колоний и минимизировать их слияние (Pike, Robinson, 1970). Дальнейшее развитие метода шло по пути использования различных смесей цитокинов и разных фидерных слоев, в том числе — из стромальных клеток, и привело к увеличению эффективности и чувствительности метода (Dexter, Lajtha, 1974; McNiece et al., 1989; Itoh et al., 1989; Koller et al., 1998; Majumdar et al., 2000; Kadereit et al., 2002). На современном этапе при проведении клонального анализа, как правило, используют готовые коммерческие среды на основе метилцеллюлозы, содержащие различные комбинации цитокинов (SCF, IL-6, IL-3, EPO и др.). Цитокины обеспечивают пролиферацию и дифференцировку гемопоэтических прогениторных клеток, приводя к образованию колоний, а метилцеллюлозная основа предупреждает слияние одиночных колоний. В зависимости от состава среды, клональный анализ

Таблица 1. Краткая характеристика ГСК и основных кроветворных предшественников, согласно классической схеме кроветворения

Название популяции	Фенотип для мыши	Фенотип для человека	Дифференцировочные потенции	Характеристика популяции	Ссылки
LT-HSC	Lin ⁻ c-Kit ⁺ Sca-1 ⁺ CD34 ⁻ CD135 ⁻ CD150 ⁺ CD48 ⁻	Lin ⁻ , CD34 ⁺ , CD38 ⁻ , CD45RA ⁻ , Thy-1 ⁺ , Rhodamin123 ^{Low} , CD49f ⁺	Все типы кроветворных клеток	Мультипотентные, имеют широкий потенциал к самообновлению, находясь в состоянии покоя (G0 стадия), восстанавливают кроветворение у вторичных реципиентов	Okada et al., 1992; Morrison, Weissman, 1994; Yang et al., 2005; Kiel et al., 2005; Adolfsson et al., 2005; Passegue et al., 2005; Majeti et al., 2007; Challen et al., 2009; Notta et al., 2011; Wilkinson et al., 2020
ST-HSC	Lin ⁻ c-Kit ⁺ Sca-1 ⁺ CD34 ⁺ CD135 ⁻ CD150 ⁺ CD48 ⁻		Все типы кроветворных клеток		
MPP	Lin ⁻ c-Kit ⁺ Sca-1 ⁺ CD34 ⁺ CD135 ⁺ CD150 ⁺ /-CD48 ⁻	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ⁻ CD45RA ⁻ CD90 ⁻ CD49F ⁻	Все типы кроветворных клеток	Мультипотентные, способность к самообновлению отсутствует, пролиферативная активность	Majeti et al., 2007; Akala et al., 2008; Oguro et al., 2013; Eich et al., 2019
CMF	Lin ⁻ c-Kit ⁺ Sca-1 ⁻ I17α ⁺ CD34 ⁺ CD16/32 ⁻	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ⁺ CD45RA ⁻	Гранулоцитарно-макрофагальные предшественники и мегакариоцитарно-эритроцитарные предшественники	Олигопотентные, пролиферативная активность	Akashi et al., 2000; Ishikawa et al., 2007; Giebel, Punzel, 2008
CLP	Lin ⁻ c-Kit ⁺ Sca-1 ⁺ I17α ⁺	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ⁻ /lowCD45RA ⁺ CD90 ⁻	В-лимфоциты, Т-лимфоциты и NK-клетки	Олигопотентные, пролиферативная активность	Akashi et al., 2000; Ishikawa et al., 2007; Giebel, Punzel, 2008
MEP	Lin ⁻ c-Kit ⁺ Sca-1 ⁻ I17α ⁻ CD34 ⁻ CD16/32 ⁻	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ^{low} -CD45RA ⁻ IL3Rα ⁻	Мегакариоциты и эритроциты	Олигопотентные, пролиферативная активность	Akashi et al., 2000; Giebel, Punzel, 2008
GMP	Lin ⁻ c-Kit ⁺ Sca-1 ⁻ I17α ⁻ CD34 ⁺ CD16/32 ⁺	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ⁺ CD45RA ⁺ IL3Rα ^{low}	Гранулоциты, макрофаги и дендритные клетки	Олигопотентные, пролиферативная активность	Akashi et al., 2000; Giebel, Punzel, 2008

позволяет идентифицировать эритроидные (BFU-E и CFU-E), гранулоцитарно-макрофагальные (CFU-GM, CFU-G и CFU-M), мультипотентные гранулоцитарные, эритроидные, макрофагальные и мегакариоцитарные предшественники (CFU-GEMM), а также В-лимфоидные прогениторные клетки. Например, среда MethoCult™ Optimum подходит для идентификации CFU-E, BFU-E, CFU-GM, CFU-GEMM, а такая же среда без эритропоэтина только для идентификации CFU-GM (https://www.stemcell.com/media/files/wallchart/WA10002Colonies_Derived_Human_Hematopoietic_Progenitors.pdf). При учете результатов (как правило, через 9–14 дней) анализируют морфологию образовавшихся колоний (возможно сочетание с фенотипированием) и определяют число каждого типа колоний (Canete et al., 2017; Husa et al., 2018; Ruiz et al., 2019; Kronstein-Wiedemann, Tonn, 2019). Для упрощения анализа разработаны среды, обеспечивающие ускоренное образование колоний (MethoCult™ express – <https://www.stemcell.com/methocult-express.html>), а также система визуализации (STEMvision™ – <https://www.stemcell.com/stemvision.html>, Velier et al., 2019).

Клональный анализ позволяет определить количество мультипотентных и коммитированных линейных предшественников, оценить мультипотентность исследуемой клеточной популяции, может быть использован для изучения влияния различных факторов на кроветворение (Gordon, 1993; Pessina et al., 2003, 2005; Pereira et al., 2007; Nishikawa et al., 2016; Canete et al., 2017; Kronstein-Wiedemann, Tonn, 2019), однако, он не позволяет судить о способности исследуемых клеток к самоподдержанию и не отражает их репопулирующей способности.

Для оценки способности исследуемых клеток к длительному самоподдержанию были разработаны так называемые длительные культуры (long-term cultures, LTC). LTC основаны на длительном (в течение нескольких (4–5) нед.) культивировании исследуемой популяции клеток на монослое стромальных клеток или стромальных клеточных линий (Kadereit et al., 2002; Carreras et al., 2021). Клетки, исследуемые в LTC, называют клетками, способными инициировать длительные культуры (LTC-initiating cells, LTV-ICs). Клетки, образованные в культурах LTC, в дальнейшем переносят в метилцеллюлозные среды и оценивают образование колоний различного типа. В другом варианте длительных культур образованные в них клетки анализируют морфологически *in situ*, без помещения в новые культуры – по образованию так называемой “области бульжника”. Для понимания того, каким образом проводилась детекция клеток, клетки, идентифицируемые в этом тесте, называют клетками, образующими области бульжника, а сам тест – тестом на клетки, образующие

область бульжника (cobblestone area-forming cell (CAFC) assay) (Amarachintha, Pang, 2018).

Для получения более точных результатов при проведении клонального анализа используют метод лимитирующих разведений или культивируют единичные клетки (одна клетка на лунку) в микроплатах (Gordon, 1993; Kent et al., 2013). Для изначального выделения определенных предшественников необходима тщательная предварительная сортировка клеток.

Проточная цитометрия и сортировка клеток

Проточная цитометрия позволяет идентифицировать ГСК, различные популяции прогениторных и дифференцированных клеток на основе их поверхностного фенотипа – совокупности экспрессируемых на поверхности клетки маркеров. Одного надежного маркера ГСК не существует, их идентифицируют по совокупности фенотипических маркеров. При этом маркеры, используемые для идентификации ГСК мыши и человека, существенно различаются. Поскольку ГСК мыши охарактеризованы более детально, в дальнейшем нами будет преимущественно рассматриваться фенотип ГСК, мультипотентных и олигопотентных предшественников мыши; сведения об основных маркерах этих популяций у человека приведены в табл. 1. Общей характеристикой ГСК является отсутствие экспрессии на них маркеров зрелых гемопоэтических клеток – CD2 (Т-лимфоциты и НК-клетки), CD3 (Т-лимфоциты), CD4 (Т-лимфоциты, моноциты, макрофаги, дендритные клетки и др.), CD8 (Т-лимфоциты и НК), NK1.1 (НК), B220 (В-лимфоциты), TER-119 (эритроидные клетки), CD19 (В-лимфоциты), Mac-1 (гранулоциты, НК, макрофаги) и Gr-1 (гранулоциты, макрофаги) для мыши и CD2, CD3, CD14 (моноциты), CD16 (НК, гранулоциты), CD19, CD20 (В-лимфоциты), CD56 (НК-клетки), CD11b (гранулоциты, макрофаги, моноциты) и CD235a (эритроидные клетки) для человека (Reitsma et al., 2002; Forraz et al., 2004; Frascoli et al., 2012; Norhaiza et al., 2013). В связи с этим к ГСК применяют термин “lineage negative cells” (Lin⁻). Помимо отсутствия экспрессии “линейных” маркеров, для ГСК мыши характерна экспрессия c-Kit (CD117, рецептор фактора роста тучных и стволовых клеток, рецепторная тирозинкиназа III) и Sca-1 (“stem cell antigen-1”, антиген стволовых клеток-1). Клетки Lin⁻c-Kit⁺Sca-1⁺ содержат LT-HSCs, ST-HSCs и MPPs; для идентификации LT-HSCs используют дополнительные маркеры: CD34 и CD135 (фенотип LT-HSC CD34⁻CD135⁻) и/или CD150 и CD48 (фенотип CD150⁺CD48⁻, однако такой же фенотип имеют и ST-HSCs), а также детекцию так называемой

“боковой” популяции после обработки клеток ДНК-связывающим красителем Hoechst 33342 (ГСК обладают высокой способностью к его элиминации). ST-HSCs имеют фенотип $CD34^+ CD135^- CD150^+ CD48^-$, а MPPs – $CD34^+ CD135^+ CD150^{+/-} CD48^-$ (табл. 1) (Yang et al., 2005; Kiel et al., 2005; Adolfsson et al., 2005; Challen et al., 2009; Oguro et al., 2013; Eich et al., 2019). Для идентификации более дифференцированных олигопотентных популяций используют другие панели маркеров, их подробное рассмотрение выходит за рамки настоящего обзора (Kondo et al., 1997; Giebel, Punzel, 2008; Challen et al., 2009; Mayle et al., 2013). С целью использования в исследованиях оптимальных наборов маркеров для точной идентификации популяций гемопоэтических клеток, а также для сокращения времени на поиск маркеров и отработку метода, рекомендуется применение оптимизированных многоцветных панелей, предложенных в OMIP (Eich et al., 2019).

ГСК человека идентифицируют на основе другого набора маркеров, в большинстве исследований – по фенотипу $Lin^- CD34^+ CD38^- CD45RA^- CD90^+ CD49f^+$ (Majeti et al., 2007; Notta et al., 2011). Важно отметить, что экспрессия $CD34$ отличается ГСК человека от LT-HSCs мыши (последние имеют фенотип $CD34^-$), что может быть связано как с межвидовыми различиями и отсутствием у человека популяции ГСК $CD34^-$, так и с тем, что доступные подходы к изучению ГСК человека не позволяют идентифицировать у человека малочисленную популяцию ГСК $CD34^-$ аналогичную мышинным LT-HSC. Косвенным подтверждением второго объяснения являются данные о присутствии в пуповинной крови человека клеток $CD34^-$, обладающих высоким репопулирующим потенциалом (Doulatov et al., 2012; Sumide et al., 2018).

Преимуществами проточной цитометрии является относительная простота метода и быстрое получение результата, проведение анализа на уровне единичных клеток, возможность многопараметрической оценки фенотипа клеток (с дополнительным анализом пролиферативной активности или внутриклеточного содержания отдельных факторов). Однако проведение многопараметрической проточной цитометрии характеризуется высокими рисками получения артефактов, в связи с чем требуется соответствующий уровень подготовки исследователя. Кроме того, данный метод не позволяет оценить ни мультипотентность, ни репопулирующую способность клеточных популяций – характеристики, являющиеся основными для подтверждения природы ГСК.

Трансплантация

Трансплантационный метод основан на переносе исследуемой популяции клеток летально облученным реципиентам с последующей детекцией и фенотипированием клеток донора, оценкой линейной принадлежности их потомков, скорости и длительности восстановления гемопоэза. Определение этих показателей позволяет судить о репопулирующей способности клеток донора и их мультипотентности – т.е. оценить основные критерии ГСК. Сочетание трансплантационного метода с предварительной сортировкой переносимых клеточных популяций позволяет делать выводы о репопулирующем и дифференцировочном потенциале отдельных клеточных субпопуляций и является основой для уточнения путей гемопоэза.

При применении трансплантационного метода важным является точная идентификация донорских клеток в организме реципиента. Метод трансплантации костного мозга летально облученным реципиентам был детально разработан в лаборатории Н.Г. Хрущева еще в 70-х гг. прошлого века для создания ксеногенных радиационных химер (Васильева и др., 1978). Разработка методов точной идентификации донорских клеток в организме реципиента позволила применять его для анализа, в том числе, при переносе сингенных клеток донора. Используемые в настоящее время подходы включают работу с трансгенными животными, у которых во всех кроветворных клетках стабильно экспрессируется флуоресцентный белок, использование доноров, отличающихся от реципиента по аллельным вариантам одного из генов (преимущественно *Ptprc*, имеющего аллельные варианты *CD45.1* и *CD45.2*), а также баркодирование клеток с использованием ретровирусных конструкций (Osawa et al., 1996; Gerrits et al., 2010; Yamamoto et al., 2013). Метод идентификации клеток по аллелям *CD45* подходит для оценки количества донорских клеток в популяциях миелоидных клеток, Т- и В-лимфоцитов, но не подходит для оценки донорского вклада в эритропоэз и тромбопоэз (в связи с отсутствием экспрессии *CD45* на этих популяциях). В последних двух случаях в качестве донора используют трансгенных мышей с экспрессией флуоресцентных белков, например, мышей *KuO* с экспрессией красного флуоресцентного белка *Kusabiga-Orange*, или мышей с экспрессией зеленого флуоресцентного белка – *Pdzk1ip1-GFP* или *Vwf-GFP* (Yamamoto et al., 2013; Sanjuan-Pla et al., 2013; Sawai et al., 2016).

Для более точного анализа применяют модификации трансплантационного метода, основными являются: серийные трансплантации (серийный перенос) и конкурентный перенос. При серийной трансплантации клетки донора вводят

первичным реципиентам, через 4–8 мес. выделяют клетки костного мозга и переносят их вторичным реципиентам (возможен дальнейший перенос третичным реципиентам) с последующей идентификацией и характеристикой потомков клеток первичного донора. Поскольку восстановление кроветворения у вторичных (третичных) реципиентов возможно только в случае присутствия LT-HSCs в исходной популяции донорских клеток (ST-HSCs не способны восстанавливать кроветворение у вторичного реципиента (Wilkinson et al., 2020)), метод используется для точной идентификации LT-HSCs и является основным методом оценки репопулирующей способности исследуемых клеток.

Конкурентный перенос позволяет отслеживать судьбу единичных клеток донора в организме реципиента. Поскольку перенос единичных клеток не может защитить летально-облученного реципиента от гибели (для защиты необходим перенос не менее $2-3 \times 10^5$ гемопоэтических клеток), одновременно с исследуемыми клетками переносят клетки-конкуренты, которые отличаются от потомков исследуемых индивидуальных клеток с использованием вышеупомянутых подходов (Carrelha et al., 2020).

Метод трансплантации является основным при изучении ГСК на мышинных моделях. Для изучения гемопоэза человека проводят ксенотрансплантации, перенося исследуемые популяции клеток иммунодефицитным мышам. В качестве реципиентов в разных работах использовались мыши с нарушенной функцией Т-лимфоцитов (мышь Nude, мутация в гене *Foxn1*), Т- и В-лимфоцитов (мышь SCID, мутации в генах *Rag*, В-лимфоцитов (мышь *xid* с мутацией в гене тирозинкиназы *Btk*), Т-лимфоцитов и фагоцитов (NOD-SCID), NK-клеток (мышь Bg с мутацией *beige*), Т-лимфоцитов, макрофагов и NK-клеток (NOD-SCID- $\beta 2m^{-/-}$; NOD-Scid-IL2Rnull (NSG), Nu/Bg/XID (BNX) (Bosma et al., 1983; Ito et al., 2008; Pearson et al., 2008; Doulatov et al., 2012)). Проведенные исследования показали, что относительно высокого уровня приживления клеток человека можно достичь только при использовании реципиентов, имеющих нарушение ответа одновременно лимфоцитов, макрофагов и NK-клеток (Arakawa-Hoyt et al., 1999; Dick et al., 1997; Doulatov et al., 2012; Shultz et al., 2005). Для дальнейшего повышения приживления ксеногенных клеток человека в последнее десятилетие применяют иммунодефицитных гуманизированных мышей с введенными фрагментами фетальных тимуса, селезенки или костей человека или чаще со встроенными генами, кодирующими цитокины человека, что способствует поддержанию и дифференцировке гемопоэтических клеток человека. У таких мышей наблюдается поддержание человеческого кроветворения более 12 нед. и образуются крове-

творные колонии всех типов (Fraser et al., 1995; Willinger et al., 2011; Doulatov et al., 2012; Theocharides et al., 2016; Shan et al., 2022).

Появляются вопросы к применению трансплантации как метода исследования нативного кроветворения и выявления истинных LT-HSCs, поскольку уже сама трансплантация может влиять на статус этих клеток. Например, с помощью технологий генетического мечения *in situ*, показано, что в нативных, физиологических, в отличие от стрессовых, трансплантационных, условиях LT-HSCs имеют весьма ограниченный вклад в кроветворение в течение большей части жизни, в отличие от долгоживущих предшественников (Sun et al., 2014). Такие работы ставят под сомнение производство всех типов кроветворных клеток из небольшого числа ГСК на протяжении всей жизни человека и открывают новые перспективы в изучении старения и заболеваний кроветворной системы. Несмотря на это, трансплантационный метод, по-прежнему остается “золотым стандартом” для идентификации ГСК, доказательства наличия у клеток репопулирующей способности и оценки их мультипотентности. Ограничениями метода являются высокая трудоемкость и времязатратность, а также получение информации об относительно небольшом количестве клеток. Тем не менее, именно исследования с использованием трансплантационного метода (в сочетании с сортировкой клеток и анализом единичных клеток) привели к существенному прорыву в изучении биологии ГСК и коррекции наших представлений о начальных этапах гемопоэза.

Анализ на уровне единичных клеток

Огромный вклад в изучение гемопоэза вносят методы геномного, транскриптомного, эпигенетического и протеомного профилирования. Детали, преимущества и ограничения различных методов обобщены в серии недавно опубликованных обзорных статей и выходят за рамки настоящего обзора (Lee et al., 2020; Slovin et al., 2021; Pham et al., 2021). Относительно недавний переход этих методов на уровень анализа единичных клеток, в первую очередь – разработка методов РНК-секвенирования единичных клеток (scRNA-seq), создают уникальные, ранее недоступные, возможности в области изучения гемопоэза. Доступные в настоящее время платформы scRNA-seq представлены двумя типами: на основе капель (Drop-seq, inDrop, 10 \times Genomics, Seq-well) и на основе планшетов (STRT-seq, SmartSeq, MARS-Seq). Секвенирование на основе капель обладает большей пропускной способностью, позволяет анализировать большое разнообразие клеток. Методы на основе планшетов обладают меньшей пропускной способностью, эффективны для про-

филирования меньшего числа клеток, но обладают большей чувствительностью. Для исследования гемопоэза применяют обе эти платформы (Paul et al., 2015; Zheng et al., 2018; Zhao et al., 2020; Hou et al., 2020). Их использование уже привело к получению новых данных о гетерогенности ГСПК, траекториях их дифференцировки, изменения активности генов и генных сетей в процессе дифференцировки, влияния различных факторов на молекулярный статус и направление клеточной дифференцировки. (см. раздел “Современные представления о начальных стадиях гемопоэза”, Rodriguez-Fraticelli et al., 2021).

Важной задачей в области изучения гемопоэза является соотнесение молекулярного профиля индивидуальных клеток с функциональной активностью, в связи с чем применяют сочетанное использование различных модификаций методов РНК-секвенирования единичных клеток и трансплантационного анализа. Например, объединение функциональных анализов на уровне единичных клеток с разными подходами к сортировке и анализом экспрессии генов позволило разработать новую стратегию сортировки, надежно отличающую не-ГСК и ГСК и позволяющую успешно соотносить ключевые молекулы с их функциями в этих клетках (Wilson et al., 2015).

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О НАЧАЛЬНЫХ СТАДИЯХ ГЕМОПОЭЗА

Использование новых высокотехнологичных методов анализа привело к уточнению многих положений бифуркационной модели и ее коррекции. Изменения касаются гетерогенности популяций ГСК, выявлению новых популяций коммитированных (частично коммитированных) предшественников, данных о возможности образования некоторых популяций клеток непосредственно из ГСК, минуя длинный путь дифференцировочной иерархии и др.

Гетерогенность ГСК и ГСПК

Детальные исследования ГСК привели к накоплению данных о гетерогенности данной популяции клеток. Вопрос о гетерогенности ГСК уже затрагивался нами при обсуждении двух популяций ГСК – LT-HSCs и ST-HSCs, различающихся по фенотипу и продолжительности восстановления ими кроветворения в летально облученных реципиентах (см. раздел “Основные свойства ГСК и представления об иерархической системе гемопоэза” и Kiel et al., 2005; Adolfsson et al., 2005; Passegue et al., 2005; Majeti et al., 2007; Challen et al., 2009; Notta et al., 2011). В начале 2000-х годов была определена еще одна популяция – IT-HSCs – клетки, обладающие ограниченной способностью к самообновлению, способные восстанавливать крове-

творение у реципиентов на “промежуточное” (между LT-HSCs и ST-HSCs) время и отличающиеся от LT-HSCs выраженной экспрессией CD49b (рис. 1-II, Benveniste et al., 2010; Ema et al., 2014).

Ключевым вопросом исследований последнего десятилетия стал вопрос о механизмах, определяющих путь клеточной дифференцировки и стадии, на которой определяется клеточное развитие. Исходно предполагалось, что все ГСК обладают сходным дифференцировочным потенциалом, и развитие клетки определяется на более поздней стадии клеточной дифференцировки. Однако исследования последних лет убедительно показали частичную прекоммитированность ГСК и их исходные различия по способности дифференцироваться преимущественно в миелоидном или лимфоидном направлениях.

Muller-Sieburg и соавторы (Muller-Sieburg et al., 2002) культивировали ГСК мыши в условиях лимитирующих разведений, трансплантировали полученные клетки с использованием конкурентного и серийного переносов и оценивали принадлежность потомков клеток донора к лимфоидным или миелоидным популяциям клеток. Авторам удалось показать, что компартменте ГСК присутствуют клетки, исходно частично прекоммитированные к дифференцировке преимущественно в лимфоидном направлении (Ly-bi, “lymphoid-biased”, лимфоид-смещенные или лимфоид-коммитированные), клетки, которые эффективно дифференцируются в миелоидном направлении (My-bi, “myeloid-biased”, миелоид-смещенные) и “сбалансированные” ГСК. При этом каждая субпопуляция самообновлялась с образованием “себе подобных” клеток, не давая другие типы (рис. 1-II, Muller-Sieburg et al., 2002; Muller-Sieburg et al., 2006). Dykstra и соавторы (рис. 1-II, Dykstra et al., 2007) трансплантировали единичные ГСК (клетки CD45midlin–Rho–Hoechst33342–) и клоны, полученные в результате их 4-дневного культивирования *in vitro*. Анализ лейкоцитов донорского происхождения в третьих реципиентах позволил авторам выделить 4 субпопуляции ГСК – α , β , γ и δ , обладающие способностью к длительной репопуляции. Было показано, что путь дифференцировки популяции β определяется до момента трансплантации, т.е. зависит не от внешних, а от “внутренних” факторов. Кроме того, серийные трансплантации продемонстрировали, что наибольшим миелоидным потенциалом и способностью к самообновлению обладают α клетки, а в ряду β , γ и δ снижается способность к самообновлению и происходит смещение от образования преимущественно миелоидных клеток (популяция β) к преимущественно лимфоидным клеткам (δ). Таким образом, авторы связали стадию активации ГСК с их дифференцировочным потенциалом. Близкая интерпретация следует и из других исследований. В частности, в работе Veerman и

соавторов (Beerman et al., 2010) было показано, что ГСК прекоммитированные к миелоидному направлению дифференцировки (My-biased, миелоид-уклоненные) имеют фенотип CD150⁺, а так называемые “сбалансированные” ГСК (обладающие одинаковым потенциалом к дифференцировке в миелоидном и лимфоидном направлениях) – фенотип CD150⁻.

Существование “смещенных по клонам” ГСК было показано не только на моделях с трансплантациями, т.е. в условиях экстренного гемопоэза, но и с применением технологии штрих-кодирования *in situ*, т.е. в условиях нативного гемопоэза (Rodriguez-Fraticelli et al., 2018). Данные по трансплантациям единичных стволовых клеток показали, что субпопуляции, выделенные разными авторами в пределах компартмента ГСК, схожи. Так, α -HSCs во многом пересекаются с My-bi и LT-HSCs, β -HSCs – с Ba и IT-HSCs, а γ - и δ -HSCs – с Ly-bi HSCs и ST-HSCs (Morita et al., 2010; Ema et al., 2014).

Пересмотр основных точек бифуркации и модификации иерархической модели гемопоэза

Широкое распространение исследований на уровне единичных клеток привело к сомнениям в отношении предполагаемых в иерархической модели гемопоэза точек бифуркации, в том числе первой дивергенции на уровне общих миелоидных и общих лимфоидных предшественников (CMPs и CLPs).

При проведении клонального анализа одиночных LSK Flt3⁺ мыши было обнаружено, что эти клетки, обладая лимфоидным и миелоидным потенциалом, практически утрачивали способность к образованию мегакариоцитарных и эритроидных предшественников, в отличие от LSK Flt3⁻ (ГСК). Эти клетки с фенотипом CD34⁺ Flt3⁺ TpoR⁻/low EpoR-GSFR⁺ IL7R α ⁺ PU.1⁺ GATA1⁻ SCL^{low} были названы авторами LMPPs (лимфоид-праймированные мультипотентные предшественники). В данной модели обнаруженная гетерогенность ГСПК объясняется постепенной потерей клонального потенциала при их дифференцировке, что согласуется с классической моделью за исключением определения бифуркации уже на уровне ST-HSCs, а не MPPs (рис. 1-III, Adolfsson et al., 2005).

Последующие работы показывали расположение мегакариоцитарных и эритроидных предшественников в иерархии гораздо ближе к ГСК, чем это считалось ранее (Notta et al. 2016; Miyawaki et al., 2017). Так, исследования с применением технологии штрихкодирования ДНК показали, что общий эритро-миелоидный предшественник может быть обнаружен на уровне MPPs и тогда на этом уровне, а не на уровне CMP находится первая

точка бифуркации (Perie et al., 2015). При использовании метода парных дочерних клеток из ГСК костного мозга мышей с применением флуоресцентного красителя KuO, упомянутого ранее, и у первичных, и у вторичных реципиентов были получены клетки-предшественники MyRP (миелоидно-ограниченные репопулирующие предшественники), которые обладали способностью к долговременному восстановлению кроветворения, но с дифференцировочными потенциалами, ограниченными мегакариоцитарно-эритроидно-миелоидным направлением. MyRP давали начало репопулирующим предшественникам мегакариоцитов (MkRP), репопулирующим предшественникам миелоидных клеток (CMRP) и мегакариоцитарно-эритроидным репопулирующим предшественникам (MERP). Исходя из полученных авторами данных, можно предположить, что клонально-ограниченные клетки встречаются на самых ранних стадиях среди наиболее примитивных ГСК. Иерархическая модель гемопоэза при которой предполагается наличие среди ГСК длительно репопулирующих предшественников, способных продуцировать только миелоидные и эритроидные клетки по независимому, “обходному” пути, называется моделью “миелоидного обхода (шунтирования)” (рис. 1-III, Yamamoto et al., 2013).

В настоящее время признана гетерогенность популяции MPPs. Предлагается разделение популяции на MPP1, MPP2, MPP3 и MPP4. MPP1 сходны с IT- и ST-HSCs, способны к самообновлению и восстановлению кроветворения на срок около 4 месяцев после трансплантации и характеризуются фенотипом – LSK CD150⁺ Flk2⁻ CD48⁻. MPP2 (LSK CD150⁺ Flk2⁻ CD48⁺) и MPP3 (LSK CD150⁻ Flk2⁻ CD48⁺) демонстрируют смещенность в миелоидном направлении, при этом MPP2 больше в тромбоцитарном, а MPP4 (LSK CD150⁻ Flk2⁺ CD48⁺) – в лимфоидном. Предполагается, что все MPPs образуются из ГСК параллельно, но в разном количестве, в зависимости от условий и нужд кроветворной системы. Такая модель была названа “динамической моделью кроветворения” (рис. 1-III, Pietras et al., 2015).

Изменение взглядов на дискретность популяций

В 2015 г. было опубликовано крупномасштабное исследование кроветворных клеток с применением совокупности методов РНК-секвенирования на уровне единичной клетки, FACS проточной цитометрии, различных функциональных анализов, профилирования хроматина и компьютерного моделирования. В результате этого исследования была составлена карта динамических состояний транскрипции в основных популяциях

миелоидных предшественников, показано, что предполагаемые ранее дискретные группы предшественников, например СМР, содержат несколько отдельных групп клеток с разной степенью родства и обнаружены клеточные кластеры, не вписывающиеся в иерархическую модель гемопоэза (Paul et al., 2015). Данное исследование привело к появлению большого количества работ по изучению транскриптома единичных кроветворных клеток и реконструкции отношений между ними (Macauley et al., 2016; Velten et al., 2017; Karamitros et al., 2018; Dahlin et al., 2018). Был накоплен ряд данных об изменениях потенциала и фенотипа кроветворных клеток в зависимости от стадии клеточного цикла. Однако эксперименты с отсортированными по фазам клеточного цикла и трансплантированными клетками, показали, что 50% долгоживущих репопулирующих клеток находятся в S, G2 или даже M фазах клеточного цикла. Эксперименты с тимидином и бромдезоксипридином подтверждали, что большинство ГСК проходят S-фазу в течении 2 сут и при этом при трансплантации облученным животным часть этих клеток демонстрировала свойства LT-HSCs (Goldberg et al., 2014; Quesenberry et al., 2014). Результатом этих работ стала смена представлений о кроветворных предшественниках, как о наборе отдельных, фенотипически и функционально разделяемых популяций и предложена новая модель непрерывного гемопоэза. Согласно этой модели, гетерогенность ГСК является следствием не наличия разных субпопуляций в их составе, а постоянно меняющейся природой самих стволовых клеток (рис. 1-IV, Quesenberry et al., 2017). Переход через четкие мультипотентные и бипотентные стадии в этой модели отсутствует, как и четкая граница между стволовыми клетками и клетками-предшественниками. Клетки конкретной кроветворной линии непрерывно возникают непосредственно из континуума низкопраймированных недифференцированных кроветворных стволовых клеток и клеток-предшественников, называемых CLOUD-HSPCs (Velten et al., 2017; Cheng et al., 2020). Для наглядного представления современного взгляда на гемопоэз так же используют ландшафт Уоддингтона, где ГСК могут “выбирать” один из множества возможных маршрутов с помощью небольших различий в экспрессии генов, все больше склоняясь к определенному направлению, ведущему к одному из типов клеток (Velten et al., 2017).

Пересмотр взглядов на гемопоэз привел к поиску новых факторов и условий, определяющих выбор клетками дальнейшей судьбы и влияющих на состояние клеток в условиях стресса. Было показано, что ГСК, находящиеся на стадии G0 клеточного цикла, пребывают на разной “глубине” покоя. Это положение подтверждается различиями в экспрессии PAK4, CDK6 и CD112, определя-

ющих эпигенетические изменения и различные состояния G0, в ответ на стрессовые воздействия и наблюдениями после трансплантаций, которые показывают, что отдельные клоны ГСК начинают активироваться и участвовать в кроветворении после длительной латентной фазы в 1–2 года. Для выхода LT-ГСК из латентного состояния требуются сильные стрессовые стимулы, такие как вторичная трансплантация или действие 5-фторурацила (Kaufmann et al., 2021). Предполагают, что такие позже активирующиеся ГСК могут служить резервом при стрессе и резкой потере одного из типов кроветворных клеток (Haas et al., 2018).

ГСК экспрессируют цитокиновые рецепторы, связанные с кроветворением, такие, как рецептор макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF), рецептор эритропоэтина (EpoR), рецепторная тирозинкиназа 3 класса (Flt3), рецептор гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), рецептор тромбопоэтина (TpoR). Было показано, что воздействие на ГСК M-CSF способствует индукции главного миелоидного регулятора PU.1 и направляет клетки по миелоидному пути (Mossadegh-Keller et al., 2013). Действие на мультипотентные предшественники лиганда Flt3 стимулирует их развитие по миелоидно-лимфоидному пути, подавляя образование мегакариоцитов и эритроидных предшественников (Tsarogas et al., 2014). А воздействие Epo на ГСК и мультипотентные предшественники сдвигает дифференцировку в эритроидном направлении (Grover et al., 2014). Повышающиеся в стрессовых условиях уровни цитокинов, могут влиять на клональный выход кроветворных клеток. Опираясь на результаты экспериментов с цитокинами и на данные о гетерогенности ГСК некоторые авторы предлагают модель “естественного отбора гемопоэза”. Согласно этой модели ГСК выбирают случайно один из возможных путей развития, далее дочерние клетки развиваются в направлении, к которому они “аффилированы”, выбирая “подходящую” по цитокинам нишу. При этом между цитокином и экспрессией его рецептора в клетках имеется положительная обратная связь, что еще больше “укрепляет” выбор (Brown et al., 2020).

По-видимому, гетерогенность ГСК определяется комбинацией внутренних (конфигурация хроматина, эпигенетические факторы) и внешних (определяемых преимущественно стромальными клетками и их продуктами, т.е. “нишей” кроветворных клеток) факторов. Установление причин гетерогенности должно быть предметом дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На протяжении многих лет общепринятой считалась иерархическая модель гемопоэза, согласно которой все многообразие клеток крови образуется из однотипных клеток предшественников — гемопоэтических стволовых клеток — в результате процесса их иерархической дифференцировки. Популяция ГСК представлялась как гомогенная популяция однотипных клеток, характеризующихся, с одной стороны, способностью длительное время находиться в покое, а с другой — способностью к самообновлению и дифференцировке. Гемопоэтическая дифференцировка рассматривалась как четко выстроенный процесс образования из ГСК дифференцированных унипотентных клеток, основанный на ступенчатых бифуркациях, каждая из которых постепенно сужает дальнейший дифференцировочный потенциал клетки, в конечном итоге приводя к образованию всего многообразия клеток крови. Основными положениями иерархической модели являются выделение дискретных относительно гомогенных популяций дифференцирующихся клеток и представление о строго упорядоченном характере перехода одной популяции клеток в другую.

Хотя иерархическая схема гемопоэза сохраняет свое значение и в наши дни, исследования последних лет внесли в нее значительные коррективы. Показано, что ГСК не являются гомогенной популяцией, а представляют собой гетерогенную совокупность клеток, различающихся между собой по экспрессии ряда поверхностных маркеров, “глубине” покоя и репопулирующей способности; выделены субпопуляции LT-HSCs, IT-HSCs, ST-HSCs, показана неоднородность каждой из них. Обнаружено, что уже на уровне ГСК имеет место частичная коммитированность клеток в миелоидном или лимфоидном направлении. Выделены новые субпопуляции мультипотентных предшественников (MMP2-4), описана ранее не включенная в схему популяция предшественников, способных дифференцироваться в лимфоидном и миелоидном, но не мегакариоцитарно-эритроидном направлении (LMPP). Описана возможность образования непосредственно из ГСК популяций предшественников, коммитированных в миелоидным или мегакариоцитарном направлении, сохраняющих репопулирующую способность. Продемонстрировано существование континуума дифференцировочных состояний ГСПК (в противовес четкому выделению отдельных популяций в классической иерархической модели гемопоэза). Совокупность полученных данных меняет устоявшиеся взгляды на гемопоэз и позволяет рассматривать его как процесс, происходящий в условиях динамического равновесия, чувствительный к факторам микроокружения, способный тонко, а не “скачкообразно”, реагировать на

изменения микроокружения. Эти представления важны для разработки методов получения и наращивания различных популяций гемопоэтических клеток с целью клинического применения, для выяснения механизмов и факторов, вызывающих гемопоэтические сдвиги в условиях патологии (например, при инфекционных заболеваниях), разработки методов коррекции гемопоэза при различных заболеваниях.

В настоящем обзоре нами были рассмотрены только основы современных представлений о кроветворении и методы, используемые при его изучении. В последние годы внимание исследователей преимущественно уделяется изучению молекулярных механизмов регуляции гемопоэза, включая механизмы поддержания ГСК в покое, инициации их дифференцировки, эпигенетической регуляции, отработке методов генетической коррекции и экспансии ГСК в условиях *in vitro*. Рассмотрение этих вопросов является предметом отдельного анализа и обобщения.

СОКРАЩЕНИЯ

BFU-E — erythroid burst-forming unit, взрывообразующая единица эритроцитов, ранний предшественник эритроидных клеток.

CAFC-assay — cobblestone area-forming cell assay, тест на клетки, образующие область булыжника.

CFU-E — erythroid colony-forming unit, колониеобразующая единица (унипотентный предшественник) эритроцитов.

CFU-G — granulocyte colony-forming unit, колониеобразующая единица (полипотентный предшественник) гранулоцитов.

CFU-GEMM — colony-forming unit — granulocyte, erythroid, monocyte, megakaryocyte, мультипотентный предшественник гранулоцитов, эритроцитов, моноцитов и мегакариоцитов.

CFU-GM — granulocyte-monocyte colony-forming unit, колониеобразующая единица (полипотентный предшественник) гранулоцитов и моноцитов.

CFU-M — monocyte colony-forming unit, колониеобразующая единица (унипотентный предшественник) моноцитов.

CMPs — common myeloid progenitors, общие миелоидные предшественники.

CMRP — репопулирующий предшественник миелоидных клеток.

CLPs — common lymphoid progenitors, общие лимфоидные предшественники.

G-CSF — гранулоцитарный колониестимулирующий фактор.

IL3 — interleukin 3, интерлейкин 3.

IL6 — interleukin 6, интерлейкин 6.

LTC – long-term culture, длительные культуры.

LT-HSCs – long-term hematopoietic stem cells, длительно репопулирующие ГСК.

LTV-ICs – LTC-initiating cells, клетки, иницирующие длительные культуры.

LMPPs – lymphoid-primed multi-potential progenitors, лимфоид-праймированные мультипотентные предшественники.

M-CSF – макрофагальный колониестимулирующий фактор.

MDA – multiple displacement amplification, множественная амплификация смещения.

MERP – мегакариоцитарно-эритроидный репопулирующий предшественник.

MPPs – multipotent progenitors, мультипотентные предшественники.

MkRP – репопулирующий предшественник мегакариоцитов.

MyRP – миелоидно-ограниченные репопулирующие предшественники.

NK – natural killer, естественные киллеры.

OMIP – optimized multicolor immunofluorescence panel, оптимизированная многоцветная иммуофлуоресцентная панель.

SCID – severe combined immunodeficiency, тяжелый комбинированный иммунодефицит.

EMP – erythro-myeloid progenitor, эритромиелоидный предшественник.

EPO – erythropoietin, эритропоэтин.

SCF – stem cell factor, фактор стволовых клеток.

ST-HSCs – short-term hematopoietic stem cells, коротко репопулирующие ГСК.

WGA – whole genome amplification, полногеномная амплификация.

ГСК – гемопоэтические стволовые клетки.

ГСПК – гемопоэтические стволовые и прогениторные клетки.

АГМ – орто-гонадо-мезонефрос.

КОЕ-С – колониеобразующие единицы селезенки.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН 2022 г. № 0088-2021-0016.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования люди и животные не использовались в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Васильева Т.В., Мичурина Т.В., Хрущев Н.Г.* Иммуофлуоресцентное исследование происхождения клеток соединительной ткани у ксеногенных радиационных химер в норме и при асептическом воспалении // *Онтогенез*. 1978. Т. 9. № 3. С. 288–290.
- Гордеев М.Н., Бахмет Е.И., Томилин А.Н.* Динамика плюрипотентности в эмбриогенезе и в культуре // *Онтогенез*. 2021. Т. 52. № 6. С. 429–440.
- Терских В.В., Васильев А.В., Воротеляк Е.А.* Поляризация и ассиметричное деление стволовых клеток // *Цитология*. 2007. Т. 49. № 11. С. 933–938.
- Adolfsson J., Mansson R., Buza-Vidas N. et al.* Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythromegakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment // *Cell*. 2005. V. 121(2). P. 295–306.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.013>
- Amarachintha S., Pang Q.* Cobblestone area-forming cell assay of mouse bone marrow hematopoietic stem cells // *Bio Protoc*. 2018. V. 8(9). P. e2824.
<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2824>
- Akala O.O., Park I.K., Qian D. et al.* Long-term haematopoietic reconstitution by Trp53-/-p16Ink4a-/-p19Arf-/- multipotent progenitors // *Nature*. 2008. V. 453(7192). P. 228–232.
<https://doi.org/10.1038/nature06869>
- Akashi K., Traver D., Miyamoto T. et al.* A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages // *Nature*. 2000. V. 404(6774). P. 193–197.
<https://doi.org/10.1038/35004599>
- Arakawa-Hoyt J., Dao M.A., Thiemann F. et al.* The number and generative capacity of human B lymphocyte progenitors, measured in vitro and in vivo, is higher in umbilical cord blood than in adult or pediatric bone marrow // *Bone Marrow Transplant*. 1999. V. 24(11). P. 1167–1176.
<https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1702048>
- Beerman I., Bhattacharya D., Zandi S. et al.* Functionally distinct hematopoietic stem cells modulate hematopoietic lineage potential during aging by a mechanism of clonal expansion // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107(12). P. 5465–5470.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1000834107>
- Benveniste P., Frelin C., Janmohamed S. et al.* Intermediate-term hematopoietic stem cells with extended but time-limited reconstitution potential // *Cell Stem Cell*. 2010. V. 6(1). P. 48–58.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.11.014>
- Boisset J.C., Cappellen W., Andrieu-Soler C. et al.* In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium // *Nature*. 2010. V. 464(7285). P. 116–120.
- Bosma G.C., Custer R.P., Bosma M.J.* A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse // *Nature*. 1983. V. 301(5900). P. 527–30.
<https://doi.org/10.1038/301527a0>
- Bryder D., Rossi D.J., Weissman I.L.* Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell // *Am. J. Pathol.* 2006. V. 169(2). P. 338–346.
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060312>

- Brown G.* Towards a new understanding of decision-making by hematopoietic stem cells // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21(7). P. 2362.
<https://doi.org/10.3390/ijms21072362>
- Canete A., Carmona R., Ariza L. et al.* A population of hematopoietic stem cells derives from GATA4-expressing progenitors located in the placenta and lateral mesoderm of mice // *Haematologica.* 2017. V. 102(4). P. 647–655.
<https://doi.org/10.3324/haematol.2016.155812>
- Canu G., Ruhrberg C.* First blood: the endothelial origins of hematopoietic progenitors // *Angiogenesis.* 2021. V. 24(2). P. 199–211.
<https://doi.org/10.1007/s10456-021-09783-9>
- Carrelha J., Linc D.S., Rodriguez-Fraticellie A.E. et al.* Single-cell lineage tracing approaches in hematology research: technical considerations // *Experimental Hematology.* V. 9. P. 26–36.
<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2020.07.007>
- Carreras P., González I., Gallardo M. et al.* Long-term human hematopoietic stem cell culture in microdroplets // *Micromachines (Basel).* 2021. V. 12(1). P. 90.
<https://doi.org/10.3390/mi12010090>
- Challen G.A., Boles N.C., Chambers S.M.* Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGFβ1 // *Cell Stem Cell.* 2010. V. 6(3). P. 265–278.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.02.002>
- Challen G.A., Boles N., Lin K.K.Y et al.* Mouse hematopoietic stem cell identification and analysis // *Cytometry A.* 2009. V. 75(1). P. 14–24.
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.20674>
- Cheng H., Zheng Z., Cheng T.* New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation // *Protein Cell.* 2020. V. 11(1). P. 34–44.
<https://doi.org/10.1007/s13238-019-0633-0>
- Dahlin J.S., Hamey F.K., Pijuan-Sala B. et al.* A single-cell hematopoietic landscape resolves 8 lineage trajectories and defects in Kit mutant mice // *Blood.* 2018. V. 131(21). P. e1–e11.
<https://doi.org/10.1182/blood-2017-12-821413>
- Dexter T.M., Lajtha L.G.* Proliferation of haemopoietic stem cells *in vitro* // *Br. J. Haematol.* 1974. V. 28(4). P. 525–530.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1974.tb06671.x>
- Dick J.E., Bhatia M., Gan O. et al.* Assay of human stem cells by repopulation of NOD/SCID mice // *Stem Cells.* 1997. V. 15. Suppl. 1. P. 199–203.
<https://doi.org/10.1002/stem.5530150826>
- Dimitris K., Stoilova B., Aboukhalil Z. et al.* Heterogeneity of human lympho-myeloid progenitors at the single cell level // *Nat Immunol.* 2018. V. 19(1). P. 85–97.
<https://doi.org/10.1038/s41590-017-0001-2>
- Dzierzak E., Bigas A.* Blood development: Hematopoietic stem cell dependence and independence // *Cell Stem Cell.* 2018. V. 22. № 5. P. 639–651.
- Doulatov S., Notta F., Laurenti E. et al.* Hematopoiesis: a human perspective // *Cell Stem Cell.* 2012. V. 10(2). P. 120–136.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.006>
- Dykstra B., Kent D., Bowie M. et al.* Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs *in vivo* // *Cell Stem Cell.* 2007. V. 1(2). P. 218–229.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.05.015>
- Eich M., Trumpp A., Schmitt S.* OMIP-059: Identification of mouse hematopoietic stem and progenitor cells with simultaneous detection of CD45.1/2 and controllable green fluorescent protein expression by a single staining panel // *Cytometry A.* 2019. V. 95(10). P. 1049–1052.
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.23845>
- Ema H., Nakauchi H.* Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo // *Blood.* 2000. V. 95(7). P. 2284–2288. PMID: 10733497.
- Ema H., Morita Y., Suda T.* Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells // *Exp. Hematol.* 2014. V. 42(2). P. 74–82.
<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2013.11.004>
- Frascoli M., Proietti M., Grassi F.* Phenotypic analysis and isolation of murine hematopoietic stem cells and lineage-committed progenitors // *J. Vis. Exp.* 2012. V. 65. P. 3736.
<https://doi.org/10.3791/3736>
- Fraser C.C., Kaneshima H., Hanstee G.* Human allogeneic stem cell maintenance and differentiation in a long-term multilineage SCID-hu graft // *Blood.* 1995. V. 86(5). P. 1680–1693. PMID: 7655000.
- Forraz N., Pettengell R., McGuckin C.P.* Characterization of a lineage-negative stem-progenitor cell population optimized for *ex vivo* expansion and enriched for LTC-IC // *Stem Cells.* 2004. V. 22(1). P. 100–108.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.22-1-100>
- Gekas C., Dieterlen-Lièvre F., Orkin S.H. et al.* The placenta is a niche for hematopoietic stem cells // *Dev. Cell.* 2005. V. 8(3). P. 365–375.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.12.016>
- Gerrits A., Dykstra B., Kalmykova O.J. et al.* Cellular barcoding tool for clonal analysis in the hematopoietic system // *Blood.* 2010. V. 115(13). P. 2610–2618.
<https://doi.org/10.1182/blood-2009-06-229757>
- Giebel B., Punzel M.* Lineage development of hematopoietic stem and progenitor cells // *Biol. Chem.* 2008. V. 389(7). P. 813–824.
<https://doi.org/10.1515/BC.2008.092>
- Godin I., Garcia-Porrero J.A., Dieterlen-Lièvre F. et al.* Stem cell emergence and hemopoietic activity are incompatible in mouse intraembryonic sites // *J. Exp. Med.* 1999. V. 190(1). P. 43–52.
<https://doi.org/10.1084/jem.190.1.43>
- Goldberg L.R., Dooner M.S., Johnson K.W. et al.* The murine long-term multi-lineage renewal marrow stem cell is a cycling cell // *Leukemia.* 2014. V. 28(4). P. 813–822.
<https://doi.org/10.1038/leu.2013.252>
- Gordon M.Y.* Human haemopoietic stem cell assays // *Blood Rev.* 1993. V. 7(3). P. 190–197.
[https://doi.org/10.1016/0268-960x\(93\)90005-o](https://doi.org/10.1016/0268-960x(93)90005-o)
- Grover A., Mancini E., Moore S. et al.* Erythropoietin guides multipotent hematopoietic progenitor cells toward an erythroid fate // *J. Exp. Med.* 2014. V. 211(2). P. 181–188.
<https://doi.org/10.1084/jem.20131189>
- Haas S., Trumpp A., Milsom M.D.* Causes and consequences of hematopoietic stem cell heterogeneity // *Cell Stem Cell.* 2018. V. 22(5). P. 627–638.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.04.003>
- Hou S., Li Z., Zheng X.* Embryonic endothelial evolution towards first hematopoietic stem cells revealed by single-cell transcriptomic and functional analyses // *Cell Res.*

2020. V. 30(5). P. 376–392.
<https://doi.org/10.1038/s41422-020-0300-2>
- Husa A.M., Strobl M.R., Strajeriu A. et al. Generation of CD34 fluorescent reporter human induced pluripotent stem cells for monitoring hematopoietic differentiation // *Stem Cells Dev.* 2018. V. 27(19). P. 1376–1384.
<https://doi.org/10.1089/scd.2018.0093>
- Ishikawa F., Niuro H., Iino T. et al. The developmental program of human dendritic cells is operated independently of conventional myeloid and lymphoid pathways // *Blood.* 2007. V. 110(10). P. 3591–3660.
<https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-071613>
- Ito M., Kobayashi K., Nakahata T. NOD/Shi-scid IL2rgamma(null) (NOG) mice more appropriate for humanized mouse models // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008. V. 324. P. 53–76.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-75647-7_3
- Itoh K., Tezuka H., Sakoda H. et al. Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow // *Exp Hematol.* 1989. V. 17(2). P. 145–153. PMID: 2783573.
- Ivanovs A., Rybtsov S., Welch L. et al. Highly potent human hematopoietic stem cells first emerge in the intraembryonic aorta-gonad-mesonephros region // *J. Exp. Med.* 2011. V. 208(12). P. 2417–2427.
<https://doi.org/10.1084/jem.20111688>
- Kadereit S., Deeds L.S., Haynesworth S.E. et al. Expansion of LTC-ICs and maintenance of p21 and BCL-2 expression in cord blood CD34(+)/CD38(-) early progenitors cultured over human MSCs as a feeder layer // *Stem. Cells.* 2002. V. 20(6). P. 573–582.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.20-6-573>
- Karamitros D., Stoilova B., Aboukhalil Z. et al. Single-cell analysis reveals the continuum of human lympho-myeloid progenitor cells // *Nat. Immunol.* 2018. V. 19(1). P. 85–97.
<https://doi.org/10.1038/s41590-017-0001-2>
- Kaufmann K.B., Zeng A.G.X., Coyaud E. et al. A latent subset of human hematopoietic stem cells resists regenerative stress to preserve stemness // *Nat. Immunol.* 2021. V. 22(6). P. 723–734.
<https://doi.org/10.1038/s41590-021-00925-1>
- Kennedy M., D'Souza S.L., Lynch-Kattman M. et al. Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures // *Blood.* 2007. V. 109(7). P. 2679–2687.
<https://doi.org/10.1182/blood-2006-09-047704>
- Kent D.G., Li J., Tanna H. et al. Self-renewal of single mouse hematopoietic stem cells is reduced by JAK2V617F without compromising progenitor cell expansion // *PLoS Biol.* 2013. V. 11(6). P. e1001576.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001576>
- Kiel M.J., Yilmaz O.H., Iwashita T. et al. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells // *Comparative Study Cell.* 2005. V. 121(7). P. 1109–1121.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.026>
- Koller M.R., Manchel I., Maher R.J. et al. Clinical-scale human umbilical cord blood cell expansion in a novel automated perfusion culture system // *Bone Marrow Transplant.* 1998. V. 21(7). P. 653–663.
- Kondo M., Weissman I.L., Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow // *Cell.* 1997. V. 91(5). P. 661–672.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80453-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80453-5)
- Kronstein-Wiedemann R., Tonn T. Colony formation: an assay of hematopoietic progenitor cells // *Methods. Mol. Biol.* 2019. V. 2017. P. 29–40.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9574-5_3
- Lacaud G., Kouskoff V. Hemangioblast, hemogenic endothelium, and primitive versus definitive hematopoiesis // *Experimental Hematology.* 2017. V. 49. P. 19–24.
<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2016.12.009>
- Lange L., Morgan M., Schambach A. The hemogenic endothelium: a critical source for the generation of PSC-derived hematopoietic stem and progenitor cells // *Cell. Mol. Life Sci.* 2021. V. 78(9). P. 4143–4160.
<https://doi.org/10.1007/s00018-021-03777-y>
- Lee J., Hyeon D.Y., Hwang D. Single-cell multiomics: technologies and data analysis methods // *Exp. Mol. Med.* 2020. V. 52(9). P. 1428–1442.
<https://doi.org/10.1038/s12276-020-0420-2>
- Li Z., Lan Y., He W. et al. Mouse embryonic head as a site for hematopoietic stem cell development // *Cell Stem. Cell.* 2012. V. 11(5). P. 663–675.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.07.004>
- Macaulay I.C., Svensson V., Labalette C. et al. Single-cell RNA-sequencing reveals a continuous spectrum of differentiation in hematopoietic cells // *Cell Rep.* 2016. V. 14(4). P. 966–977.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.082>
- Majeti R., Park C.Y., Weissman I.L. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood // *Cell Stem. Cell.* 2007. V. 1(6). P. 635–645.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.10.001>
- Majumdar M.K., Thiede M.A., Haynesworth S.E. et al. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages // *J. Hematother. Stem. Cell Res.* 2000. V. 9(6). P. 841–848.
- Marella F., de Bruijn T.R., Speck N.A. et al. Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo // *EMBO J.* 2000. V. 19(11). P. 2465–2474.
- Maximow A.A. Relation of blood cells to connective tissues and endothelium // *Physiol. Rev.* 1924. V. 4. P. 533–540.
- Mayle A., Luo M., Jeong M. et al. Flow cytometry analysis of murine hematopoietic stem cells // *Cytometry A.* 2013. V. 83(1). P. 27–37.
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.22093>
- Mazo I.B., Massberg S., von Andrian U.H. Hematopoietic stem and progenitor cell trafficking // *Trends Immunol.* 2011. V. 32(10). P. 493–503.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2011.06.011>
- McGrath K.E., Frame J.M., Palis J. Early hematopoiesis and macrophage development // *Semin. Immunol.* 2015. V. 27(6). P. 379–387.
<https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.03.013>
- McNiece I., Andrews R., Stewart M. et al. Action of interleukin-3, G-CSF, and GM-CSF on highly enriched human hematopoietic progenitor cells: synergistic interaction of GM-CSF plus G-CSF // *Blood.* 1989. V. 74(1). P. 110–114. PMID: 2473792.

- Medvinsky A., Rybtsov S., Taoudi S.* Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions // *Development*. 2011. V. 138(6). P. 1017–1031. <https://doi.org/10.1242/dev.040998>
- Miyawaki K., Iwasaki H., Jiromaru T. et al.* Identification of unipotent megakaryocyte progenitors in human hematopoiesis // *Blood*. 2017. V. 129(25). P. 3332–3343. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-741611>
- Mossadegh-Keller N., Sarrazin S., Kandalla P.K. et al.* M-CSF instructs myeloid lineage fate in single haematopoietic stem cells // *Nature*. 2013. V. 497(7448). P. 239–243. <https://doi.org/10.1038/nature12026>
- Morita Y., Ema H., Nakauchi H.* Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment // *J. Exp. Med.* 2010. V. 207(6). P. 1173–1182. <https://doi.org/10.1084/jem.20091318>
- Morrison S.J., Weissman I.L.* The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype // *Immunity*. 1994. V. 1(8). P. 661–673. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90037-x](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90037-x)
- Muller-Sieburg C.E., Cho R.H., Thoman M. et al.* Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation // *Blood*. 2002. V. 100(4). P. 1302–1309. PMID: 12149211.
- Muller-Sieburg C.E., Sieburg H.B.* Clonal diversity of the stem cell compartment // *Curr. Opin. Hematol.* 2006. V. 13(4). P. 243–248. <https://doi.org/10.1097/01.moh.0000231421.00407.65>
- Nishikawa E., Matsumoto T., Isige M.* Comparison of capacities to maintain hematopoietic stem cells among different types of stem cells derived from the placenta and umbilical cord // *Regen Ther.* 2016. V. 4. P. 48–61. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2015.12.002>
- Notta F., Doulatov S., Laurenti E. et al.* Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment // *Science*. 2011. V. 333(6039). P. 218–221. <https://doi.org/10.1126/science.1201219>
- Notta F., Zandi S., Takayama N. et al.* Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny // *Science*. 2016. V. 351(6269): aab2116. <https://doi.org/10.1126/science.aab2116>
- Norhaiza H.S., Rohaya M., Zarina Z.* *In vitro* expansion of Lin⁺ and Lin[–] mononuclear cells from human peripheral blood // *AIP Conference Proceedings*. 2013. V. 1571. P. 238. <https://doi.org/10.1063/1.4858661>
- Oguro H., Ding L., Morrison S.J.* SLAM family markers resolve functionally distinct subpopulations of hematopoietic stem cells and multipotent progenitors // *Cell Stem. Cell*. 2013. V. 13(1). P. 102–116. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.05.014>
- Okada S., Nakauchi H., Nagayoshi K. et al.* *In vivo* and *in vitro* stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells // *Blood*. 1992. V. 80(12). P. 3044–3050. PMID: 1281687.
- Osawa M., Hanada K., Hamada H.* Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell // *Science*. 1996. V. 273(5272). P. 242–245. <https://doi.org/10.1126/science.273.5272.242>
- Palis J., Yoder M.C.* Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man // *Review Exp. Hematol.* 2001. V. 29(8). P. 927–936. [https://doi.org/10.1016/s0301-472x\(01\)00669-5](https://doi.org/10.1016/s0301-472x(01)00669-5)
- Passegue E., Wagers A.J., Giuriato S. et al.* Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates // *J. Exp. Med.* 2005. V. 202(11). P. 1599–1611. <https://doi.org/10.1084/jem.20050967>
- Paul F., Arkin Y., Giladi A. et al.* Transcriptional heterogeneity and lineage commitment in myeloid progenitors // *Cell*. 2015. V. 163(7). P. 1663–1677. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.013>
- Pearson T., Greiner D.L., Shultz L.D.* Humanized SCID mouse models for biomedical research // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008. V. 324. P. 53–76. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75647-7_3
- Pereira C., Clarke E., Damen J.* Hematopoietic colony-forming cell assays // *Methods. Mol. Biol.* 2007. V. 407. P. 177–208. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-536-7_14
- Perie L., Duffy K.R., Kok L. et al.* The branching point in erythro-myeloid differentiation // *Cell*. 2015. V. 163(7). P. 1655–1662. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.059>
- Pessina A., Albella B., Bayo M. et al.* Application of the CFU-GM assay to predict acute drug-induced neutropenia: an international blind trial to validate a prediction model for the maximum tolerated dose (MTD) of myelosuppressive xenobiotics // *Toxicol. Sci.* 2003. V. 75(2). P. 355–367. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg188>
- Pessina A., Malerba I., Gribaldo L.* Hematotoxicity testing by cell clonogenic assay in drug development and pre-clinical trials // *Curr. Pharm. Des.* 2005. V. 11(8). P. 1055–1065. <https://doi.org/10.2174/1381612053381648>
- Pham T., Tyagi A., Wang Y.S. et al.* Single-cell proteomic analysis // *WIREs Mech. Dis.* 2021. V. 13(1). P. e1503. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1503>
- Pietras E.M., Reynaud D., Kang Y.A. et al.* Functionally distinct subsets of lineage-biased multipotent progenitors control blood production in normal and regenerative conditions // *Cell Stem. Cell*. 2015. V. 17(1). P. 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.05.003>
- Pike B.L., Robinson W.A.* Human bone marrow colony growth in agar-gel // *J. Cell. Physiol.* 1970. V. 76(1). P. 77–84. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040760111>
- Quesenberry P.J., Goldberg L., Aliotta J. et al.* Marrow hematopoietic stem cells revisited: they exist in a continuum and are not defined by standard purification approaches; then there are the microvesicles // *Front. Oncol.* 2014. V. 4. P. 56. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00056>
- Quesenberry P., Goldberg L., Dooner M. et al.* Hematopoietic Stem Cells: Uncomfortable Considerations // *Curr. Mol. Biol. Rep.* 2017. V. 3(3). P. 165–171. <https://doi.org/10.1007/s40610-017-0068-4>
- Reitsma M.J., Lee B.R., Uchida N.* Method for purification of human hematopoietic stem cells by flow cytometry //

- Methods. Mol. Med. 2002. V. 63. P. 59–77.
<https://doi.org/10.1385/1-59259-140-X:059>
- Rodriguez-Fraticelli A.E., Camargo F. Systems analysis of hematopoiesis using single-cell lineage tracing // Curr. Opin. Hematol. 2021. V. 28(1). P. 18–27.
<https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000624>
- Rodriguez-Fraticelli A., Wolock S.L., Weinreb C.S. et al. Clonal analysis of lineage fate in native haematopoiesis // Nature. 2018. V. 553(7687). P. 212–216.
<https://doi.org/10.1038/nature25168>
- Ruiz J.P., Chen G., Mora J.J.H. et al. Robust generation of erythroid and multilineage hematopoietic progenitors from human iPSCs using a scalable monolayer culture system // Stem Cell Res. 2019. V. 41. P. 101600.
<https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101600>
- Sagoo P., Gaspar H.B. The transformative potential of HSC gene therapy as a genetic medicine // Gene Ther. 2021. Online ahead of print.
<https://doi.org/10.1038/s41434-021-00261-x>
- Sanjuan-Pla A., Macaulay I.C., Jensen C.T. et al. Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy // Nature. 2013. V. 502. P. 232–236.
<https://doi.org/10.1038/nature12495>
- Sawai C.M., Babovic S., Upadhaya S. et al. Hematopoietic stem cells are the major source of multilineage hematopoiesis in adult animals // Immunity. 2016. V. 45(3). P. 597–609.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.08.007>
- Shan L., Flavell R.A., Herndler-Brandstetter D. Development of humanized mouse models for studying human NK cells in health and disease // Methods. Mol. Biol. 2022. V. 2463. P. 53–66.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2160-8_5
- Shultz L.D., Lyons B.L., Burzenski L.M. et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hematopoietic stem cells // J. Immunol. 2005. V. 174. P. 6477–6489.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.6477>
- Sender R., Milo R. The distribution of cellular turnover in the human body // Nat. Med. 2021. V. 27(1). P. 45–48.
<https://doi.org/10.1038/s41591-020-01182-9>
- Slovin S., Carissimo A., Panariello F. Single-Cell RNA sequencing analysis: a step-by-step overview // Methods. Mol. Biol. 2021. V. 2284. P. 343–365.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1307-8_19
- Sumide K., Matsuoka Y., Kawamura H. A revised road map for the commitment of human cord blood CD34-negative hematopoietic stem cells // Nature Communications. 2018. V. 9. P. 2202.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-04441-z>
- Sun J., Ramos A., Chapman B. et al. Clonal dynamics of native haematopoiesis // Nature. 2014. V. 514(7522). P. 322–327.
<https://doi.org/10.1038/nature13824>
- Theocharides A., Rongvaux A., Kristin F. et al. Humanized hemato-lymphoid system mice // Haematologica. 2016. V. 101(1). P. 5–19.
<https://doi.org/10.3324/haematol.2014.115212>
- Till J.E., McCulloch E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells // Radiat Res. 1961. V. 14. P. 213–222. PMID: 13776896.
- Tsapogas P., Swee K.L., Nusser A. et al. In vivo evidence for an instructive role of fms-like tyrosine kinase-3 (FLT3) ligand in hematopoietic development // Haematologica. 2014. V. 99(4). P. 638–646.
<https://doi.org/10.3324/haematol.2013.089482>
- Velier M., Chateau A.L., Malenfant C. et al. Validation of a semi automatic device to standardize quantification of Colony-Forming Unit (CFU) on hematopoietic stem cell products // Cytotherapy. 2019. V. 21(8). P. 820–823.
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.06.005>
- Velten L., Haas S.F., Raffel S. et al. Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process // Nat. Cell. Biol. 2017. V. 19(4). P. 271–281.
<https://doi.org/10.1038/ncb3493>
- Wilkinson A.C., Igarashi K.J., Nakauchi H. Haematopoietic stem cell self-renewal in vivo and ex vivo // Nat. Rev. Genet. 2020. V. 21(9). P. 541–554.
<https://doi.org/10.1038/s41576-020-0241-0>
- Willinger T., Rongvaux A., Strowig T. Improving human hemato-lymphoid-system mice by cytokine knock-in gene replacement // Trends. Immunol. 2011. V. 32(7). P. 321–327.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2011.04.005>
- Wilson N., Kent D.G., Buettner F. Combined single-cell functional and gene expression analysis resolves heterogeneity within stem cell populations // 2015. Cell Stem. Cell. V. 16(6). P. 712–724.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.04.004>
- Wittamer V., Bertrand J.Y. Yolk sac hematopoiesis: does it contribute to the adult hematopoietic system? // Cell Mol. Life Sci. 2020. V. 77(20). P. 4081–4091.
<https://doi.org/10.1007/s00018-020-03527-6>
- Yamamoto R., Morita Y., Ooehara J. et al. Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells // Cell. 2013. V. 154(5). P. 1112–1126.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.007>
- Yang L., Bryder D., Adolfsson J. et al. Identification of Lin(–) Sca1(+) kit(+) CD34(+) Flt3– short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients // Blood. 2005. V. 105(7). P. 2717–2723.
<https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2159>
- Zhao X., Gao S., Kajigaya S. et al. Comprehensive analysis of single-cell RNA sequencing data from healthy human marrow hematopoietic cells // BMC Res. Notes. 2020. V. 13(1). P. 514.
<https://doi.org/10.1186/s13104-020-05357-y>
- Zhang P., Li X., Pan C. et al. Single-cell RNA sequencing to track novel perspectives in HSC heterogeneity // Stem. Cell Res. Ther. 2022. V. 13(1). P. 39.
<https://doi.org/10.1186/s13287-022-02718-1>
- Zovein A.C., Hofmann J.J., Lynch M. et al. Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells // Cell Stem. Cell. 2008. V. 3(6). P. 625–636.

Hematopoietic Stem Cell and Initial Stages of Hemopoiesis: Research Methods and Modern Concepts

O. N. Sheveleva¹, * and I. V. Lyadova¹

¹Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

**e-mail: on_sheveleva@mail.ru*

Hematopoietic stem cells (HSCs) have long been one of the most well-studied type of stem cells. Multiple experimental and clinical studies allowed to characterize the main HSC properties, elaborate methodological approaches for their analyses and ultimately led to the formulation of hierarchical theory of hematopoiesis. According to the hierarchical theory, HSCs stand at the root of the hematopoietic tree and are characterized by high self-renewal and multipotent differentiation capacities. Following the differentiation, HSC successively give rise to diverse hematopoietic precursors that ultimately produce the whole variety of differentiated blood cells. The concept on the strict sequence of HSC differentiation has recently changed, largely, due to the development and implementation of new hi-tech methods of cell differentiation analysis. This review summarizes classical views on HSC biology and early stages of their differentiation, outlines main methodological approaches used in HSC studies and discusses recent achievements and modern views on the early stages of hematopoiesis.

Keywords: hematopoietic stem cells, hematopoiesis, heterogeneity, hierarchy