

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ «SIDE POPULATION» ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ ТКАНЯХ

Цынкаловский О.Р.¹, Зайденов В.А.², Пахотных А.С.³,
Андрианов В.А.⁴

¹ Медицинский факультет Бергенского университета, г. Берген, Норвегия

² Институт трансплантологии и искусственных органов Росмедтехнологий, Москва

³ Хирургический центр Узловой железнодорожной больницы, г. Тимашевск

⁴ Краевой нефрологический центр, г. Краснодар

Резюме. Анализ клеток костного мозга мышей, окрашенного флуоресцентным красителем Hoechst 33342, на проточном цитометре позволяет выявить side population (SP), которая в значительной степени обогащена гемопоэтическими стволовыми клетками, способными полностью восстанавливать кроветворение у летально облученных реципиентов. В последние годы эта методика также использовалась для анализа клеток SP в некроветворных тканях и злокачественных опухолях. Хотя фенотип и функции SP во многих тканях до конца не изучены, методика выделения SP может быть полезна для анализа и получения популяций клеток, обладающих свойствами стволовых. В данном обзоре приводится краткое описание методики и анализируются исследования SP в нормальных и опухолевых тканях.

Ключевые слова: стволовые клетки, side population, проточная цитометрия, кроветворение, опухоль.

Tsinkalovsky O.R., Zaidenov V.A., Pakhotnykh A.S., Andrianov V.A.

EMPLOYMENT OF A «SIDE POPULATION» APPROACH TO STEM CELL ISOLATION IN NORMAL AND TUMOR TISSUES

Abstract. A combination of fluorescent staining with Hoechst 33342 dye, and flow cytometry of murine bone marrow cells may be used for separation of a side population (SP), which is highly enriched for hematopoietic stem cells capable of long-term hematopoietic reconstitution in lethally irradiated recipients. Recently, this approach was also applied to analysis of SP cells in several types of non-hematopoietic tissues, and malignant tumours. In spite of yet poor definition of phenotype and functional potency of SP cells from various tissues, the method of SP isolation may be a useful tool for analysis and pre-enrichment of stem cell-like cells of different origin. Present review article presents a brief description of Hoechst 33342-staining approach, and of recent reports concerning SP studies in various normal and malignant tissues. (*Med. Immunol.*, vol. 10, N 4-5, pp 319-326)

История «side population»

Интерес к стволовым клеткам, концепция которых была разработана А.А. Максимовым в начале прошлого века [28], значительно возрос после публикаций в начале 60-х годов работ J. Till

и E. McCulloch, впервые доказавших наличие в костном мозге клеток, способных при пересадке летально облученным животным образовывать колонии в селезенке и восстанавливать гемопоэз [39]. Стволовые клетки характеризуются двумя ключевыми свойствами. Первое – способность к самовоспроизведению (self-renewal), т.е. к образованию при делении идентичной клетки, сохраняющей способность к самовоспроизведению. Второе – способность к дифференцировке, приводящей к появлению зрелых клеток разных линий и видов [48]. Стволовые клетки играют важную роль в поддержании тканевого гомеостаза за счет замеще-

Адрес для переписки:

Oleg Tsinkalovsky, MD, PhD

Stem Cell Research Group, Department of Pathology,

The Gade Institute, Haukeland University Hospital,

5021 Bergen Norway.

Tel.: 47-55972616, 90598597 (mob.). Fax: 47-55973158.

E-mail: oleg.tsinkalovsky@gades.uib.no

ния погибших как в физиологических условиях, так и при повреждении клеток [23]. В последние годы интерес к стволовым клеткам усилился после появления гипотезы раковых стволовых клеток (cancer stem cells) [30]. Эта гипотеза связывает образование и развитие опухоли исключительно с небольшой популяцией раковых клеток, обладающих свойствами стволовых. Если гипотеза верна, такая популяция является наиболее перспективной мишенью для противораковой терапии [47].

Необходимость изучения стволовых клеток стимулировала разработку методов, позволяющих специфически анализировать эти клетки и выделять популяции, обогащенные стволовыми клетками. Одним из наиболее востребованных оказался метод анализа и сортировки клеток с помощью проточных цитометров (ПЦ)-сортировщиков [17]. Стратегия для выявления клеток основана на обнаружении характерных для клеток поверхностных белков с помощью антител, меченных флуоресцентными красителями. Определение комбинации антигенов, специфичной для кроветворных стволовых клеток костного мозга мышей [34], позволило применить подобный метод для изолирования высокоочищенных популяций стволовых клеток и способствовало значительному прогрессу в изучении биологии этих клеток [46]. Другая стратегия выделения стволовых клеток, разработанная М. Goodell с коллегами [9], была основана на различной способности клеток окрашиваться флуоресцентным красителем Hoechst 33342 (Hoechst). Исследователи обнаружили, что небольшая популяция клеток костного мозга мышей, характеризующаяся низкой флуоресценцией при окрашивании Hoechst (Hoechst флуоресценцией), в значительной степени обогащена стволовыми клетками, которые были способны полностью восстанавливать кроветворение у летально облученных мышей [9]. При анализе окрашенных клеток на проточном цитометре на двухпараметрной гистограмме популяция располагалась вдоль, в стороне от основной массы клеток с высокой Hoechst флуоресценцией (рис. 1А) и поэтому получила название *side population* (буквально, «боковая популяция»), или SP. Годом позже в той же лаборатории была охарактеризована SP костного мозга человека и макак-резусов [10]. А в 2001 году S. Zhou с коллегами описали механизм образования SP [53], доказав, что ключевую роль в формировании популяции играет транспортный белок G2 из семейства белков-переносчиков ABC (ATP-binding cassette transporters), использующих энергию АТФ для транспорта веществ. Раскрытие механизма феномена SP значительно усилило интерес к методу, и подобная популяция была описана в кроветворных тканях других видов и многих негемопоетических тканях млекопитающих как нормальных, так и опухолевых (см. ниже).

Описание метода

Подробное описание всех этапов окрашивания Hoechst, список необходимых реактивов, особенности анализа клеток на ПЦ приведены на сайте лаборатории Goodell (<http://www.bcm.edu/labs/goodell/>), а также детально обсуждается в некоторых публикациях [29, 31], поэтому приведем здесь лишь основные необходимые сведения. Клетки костного мозга отмывают, лизируют эритроциты, и после аккуратного подсчета общего количества клеток (включая живые и мертвые клетки) доводят концентрацию до 1 млн клеток в 1 мл DMEM, содержащего 2% сыворотки новорожденных ягнят. Заметим, что концентрация клеток при окрашке Hoechst заметно влияет на процент SP, поэтому подсчету следует уделить особое внимание. Рабочие разведения Hoechst 1 мг/мл удобно готовить из концентрированного раствора (например, 10 мг/мл от «Molecular Probes», США), который может долго храниться при 4°C. Конечная концентрация Hoechst для клеток костного мозга мышей составляет 5 мкг/мл, время инкубации – 90 мин. Клетки обычно инкубируют с Hoechst при 37°C в водяной бане или термостате, при этом растворы с клетками должны периодически взбалтываться для равномерности окрашивания. Обязательным для контроля методики является окрашивание образцов, преинкубированных (15 мин при 37°C) с веществами, тормозящими активность транспортного белка ABCG2, ответственного за формирование SP. В качестве ингибиторов лучше использовать reserpine (5 мкМ) или fumitremorgin C (7 мкМ), оба от «Sigma-Aldrich», США. Включение таких образцов при анализе клеток на ПЦ помогает найти SP и правильно обозначить ее границы (рис. 1). Необходимо отметить, что оптимальная концентрация для клеток других тканей/других видов может варьировать (от 2 до 15 мкг/мл), так же как и оптимальное время инкубации (от 45 до 120 мин), поэтому перед началом экспериментов следует провести предварительные тесты (включая образцы с ингибитором ABCG2) для выбора оптимальных условий для конкретного вида клеток. Окрашивание останавливают перенесением пробирок на лед, добавлением холодного раствора DMEM и центрифугированием при 300 g 10 мин, лучше при 4°C. Отмытые от красителя клетки могут быть окрашены дополнительно, например, антителами против поверхностных белков, однако при этих процедурах следует избегать согревания клеток. Опыт нашей лаборатории показывает, что окрашенные клетки при хранении в холодильнике (при 4°C) сохраняют фенотип SP даже спустя 2 недели и могут использоваться для настройки проточного цитометра. Непосредственно перед анализом к клеточной взвеси добавляют propidium iodide (конечная концентрация

2 мкг/мл), окрашивающий мертвые клетки, которые следует исключить из анализа.

В целом, освоить метод для получения SP не сложно, особенно если для начала использовать клетки костного мозга мышей, которые являются прекрасным стандартом и могут служить в качестве контроля.

Проточная цитометрия

Для анализа окрашенных Hoechst клеток ПЦ должен быть оборудован ультрафиолетовым лазером (например, с длиной волны около 365 нм), и тщательная настройка лазера крайне важна для выявления SP. Можно использовать лазер с фиолетовым спектром волны – около 404 нм [33], однако следует признать, что такой вариант для анализа Hoechst флуоресценции не является оптимальным [38]. Возможно, более удачной альтернативой является замена Hoechst на другой краситель, например, DyeCycle™ Violet («Molecular Probes», США), для которого достаточно фиолетового лазера [37]. Опробовано также использование более дешевых источников ультрафиолетового света [5].

Флуоресценция Hoechst, проходящая через оптическое зеркало 610 DMSP, за счет использования оптических фильтров регистрируется в голубом (450/20 BP) и красном (675 EFLP) спектрах (зеркало и фильтры – от Omega Optical, США). Для анализа SP нужно исключить клеточные агрегаты, мертвые клетки и клеточные обломки. На рисунке 2 представлен пример логической последовательности анализа клеток для выявления SP. «Классическая» SP костного мозга мышей имеет характерную вытянутую форму в виде «хвоста» (рис. 1А), составляет менее 0,1% от общей популяции (обычно 0,05–0,06%) и почти полностью исчезает в присутствии ингибиторов ABCG2 (рис. 1Б и В).

Механизм формирования SP

Низкая флуоресценция Hoechst в клетках SP человека объясняется активностью мембранных транспортных белков суперсемейства ABC (использующих энергию АТФ), в частности ABCG2 [53], известного также как BCRP1 (breast cancer resistant protein) – белок, обуславливающий лекарственную резистентность клеток рака молочной железы. Некоторую роль может играть ABCB1, или MDR1 (Multidrug resistant protein), также формирующий устойчивость раковых клеток к лекарственным веществам.

Связывающийся с ДНК Hoechst проникает в одинаковой степени во все клетки, однако небольшой процент клеток способен с помощью указанных белков интенсивно «выкачивать» краситель из клеток. Hoechst флуоресценция в этих клетках снижается, и таким образом формируется SP. При торможении работы белков-переносчиков Hoechst остается в клетках, что соответственно препятствует образованию SP. При этом количество и функции стволовых клеток остаются в норме.

По-видимому, транспортные белки ABC являются не единственными переносчиками Hoechst, т.к. мыши с тройным нокаутом *Mdr1a/b/Vcrp1* не погибают, а SP в клетках костного мозга исчезает не полностью [16].

Активность белков-переносчиков обратно пропорциональна степени дифференцировки стволовых клеток SP. Клетки, располагающиеся на двухпараметрной гистограмме в нижней части «хвоста» SP, являются наименее дифференцированными и обладают наиболее выраженной способностью восстанавливать кроветворение у облученных реципиентов [6, 10].

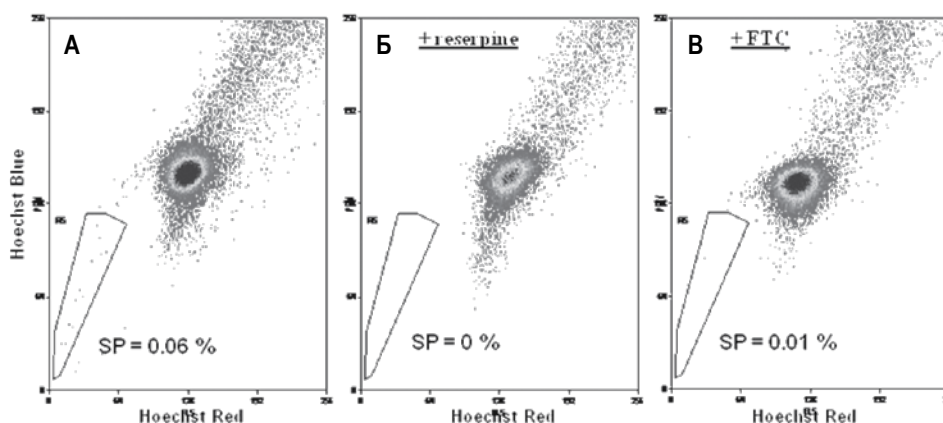


Рисунок 1. Анализ side population (SP) клеток костного мозга мышей методом проточной цитометрии

Примечания. Клетки костного мозга инкубировались 90 мин при 37°C с 5 мкг/мл Hoechst 33342 без (А) или в присутствии ингибиторов ABCG2 – 5 мкМ reserpine (Б) или 7 мкМ fumitremorgin C, FTC (В). Окрашивание останавливали добавлением холодного раствора DMEM, содержащим 2% сыворотки новорожденных ягнят, и перенесением пробирок на лед. Полигональная область ограничивает SP, содержание которой обозначено на каждой гистограмме. Мертвые клетки и клеточные обломки исключены из анализа.

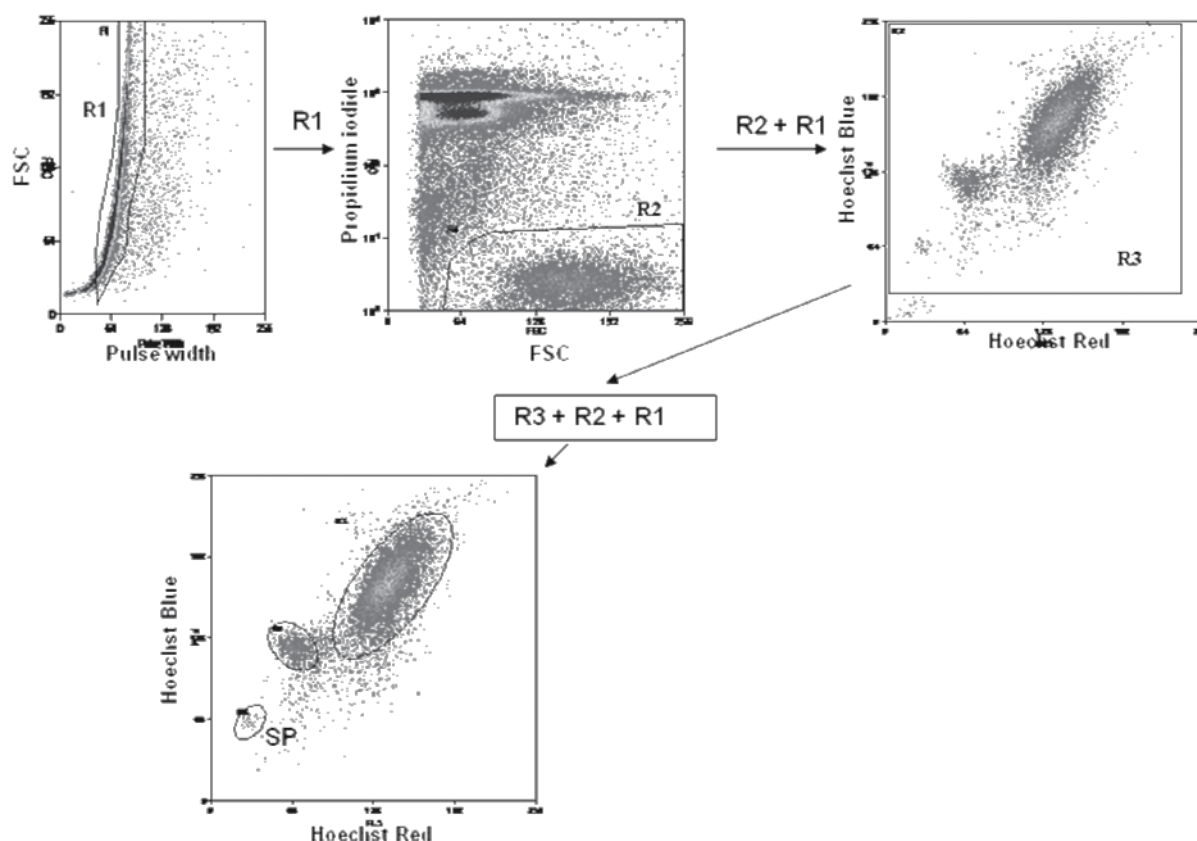


Рисунок 2. Логическая последовательность анализа кроветворных клеток, окрашенных Hoechst 33342, для выявления side population (SP) методом проточной цитометрии

Примечания. Кроветворные клетки рыб *Danio rerio* окрашены Hoechst 33342 и propidium iodide. Исключение из анализа клеточных агрегатов (клетки за пределами выделенной области (R) R1, мертвых клеток, окрашенных положительно propidium iodide, (клетки за пределами R2), и клеточных обломков (клетки за пределами R3) на соответствующих последовательных гистограммах верхнего ряда позволяет легко отделить SP от других популяций на гистограмме в нижнем ряду. FSC – forward scatter, прямое светорассеивание, регистрируемое под углом 1° , представляет информацию о размерах клеток.

Критические замечания о методе

Критические комментарии в адрес метода, обсуждающие адекватность его использования для обогащения стволовых клеток, прежде всего указывают на токсичность Hoechst для живых клеток. В клетках основной популяции (не-SP), неспособных выводить краситель, его токсический эффект должен проявляться более заметно, а значит нельзя исключить возможность того, что SP в большей мере объединяет клетки, которым удастся избежать повреждающего действия красителя, чем клетки со свойствами стволовых [31]. Безусловно, высокая активность в клетках SP транспортных белков, в частности ABCG2, снижает концентрацию, а значит и токсичность Hoechst, что дает этим клеткам определенные преимущества. Однако данные нескольких работ свидетельствуют о том, что жизнеспособность клеток основной (не-SP) популяции после окраски Hoechst мало отличается от таковой неокра-

шенных клеток [8, 9, 50], и эти клетки способны выживать после введения *in vivo* [8].

Другая часть критических замечаний отмечает высокую чувствительность метода к условиям его выполнения [29, 31]. Действительно, т.к. выведение Hoechst из клеток представляет собой динамичный процесс, даже небольшие изменения концентрации клеток или красителя, времени или температуры инкубации клеток приводят к изменению формирования SP. Однако соблюдение условий окрашивания, тщательное предварительное тестирование метода на надежной системе (например, клетках костного мозга мышей), включение контрольных образцов при окрашивании помогают стабильно получать воспроизводимые результаты.

Практически любой метод выделения клеток имеет те или иные недостатки, и Hoechst метод не является исключением. Однако понимание принципа метода, знание его особенностей и приобретение определенного опыта использования помогают такие недостатки избежать.

SP в нормальных тканях

Наиболее детально SP изучена в кроветворной ткани мышей [2, 9, 43]. Изолирование клеток с фенотипом SP приводит к 1000-3000-кратному обогащению популяции гемопоэтических клеток стволовыми клетками, обладающими способностью при пересадке восстанавливать гемопоэз у летально облученных реципиентов. По этому показателю эффективность Hoechst метода сравнима с методами, основанными на использовании комбинации антител к поверхностным маркерам стволовых клеток [9]. Еще более впечатляющие результаты дает комбинирование двух методов, когда клетки SP дополнительно разделяются в зависимости от экспрессии поверхностных белков. Выделенные таким образом $c\text{-Kit}^+\text{Sca-1}^+\text{Lin}^-$ клетки SP (т.е. SP-клетки, которые экспрессируют $c\text{-kit}$ и Sca-1 антигены, но не маркеры дифференцированных клеток костного мозга) представляют собой неделимые стволовые клетки, характеризующиеся наиболее выраженной способностью восстанавливать кроветворение в организме летально облученных мышей [2, 43]. Стволовые клетки нормальных тканей обычно находятся в стадии G_0 клеточного цикла, т.е. редко делятся. Именно такие клетки характеризуются фенотипом SP [2]. Эксперименты в нашей лаборатории [41] показали, что клетки SP обладают значительно более высокой по сравнению с неочищенной популяцией клеток костного мозга способностью образовывать колонии кроветворных клеток *in vitro* (табл. 1). Клетки SP легко переносят сортировку на ПЦ со скоростью до 30 000 событий в секунду [41], поэтому метод окрашивания Hoechst можно с уверенностью рекомендовать для использования в экспериментальных исследованиях, изучающих кроветворные клетки костного мозга [40].

В костном мозге человека, макак-резусов и свиней SP представлена примерно в таком же проценте, как у мышей [10]. Интересно, что у обоих видов SP содержит в основном $\text{CD34}^-\text{CD38}^{+/-}$ клетки, тогда как классический фенотип стволовых кро-

ветворных клеток – $\text{CD34}^+\text{CD38}^-$. Способность CD34^- SP-клеток макак-резусов образовывать *in vitro* колонии основных кроветворных клеточных линий проявлялась только после предварительного культивирования клеток (в течение нескольких недель) на строме костного мозга. Однако частота колониеобразующих клеток среди CD34^- SP была в 9 раз выше, чем в популяции $\text{CD34}^+\text{CD38}^-$ клеток. Авторы предположили, что CD34^- SP-клетки могут являться предшественниками $\text{CD34}^+\text{CD38}^-$ стволовых клеток [10].

SP обнаружена в кроветворной ткани рыб: в нашей лаборатории изучены свойства SP у *Danio rerio*, «рыбки-зебры» [42], а Kobayashi с коллегами описали эту популяцию у карпов [22]. Наличие у рыб SP, похожей на аналогичную популяцию клеток у млекопитающих, свидетельствует о консерватизме фенотипа гемопоэтических клеток в процессе эволюции.

Успешное использование SP для обогащения костномозговых популяций кроветворными стволовыми клетками стимулировало применение метода окрашивания Hoechst для выделения стволовых клеток в других тканях. У человека SP была выявлена в клетках сердечной мышцы [27], островков Лангерганса поджелудочной железы [26], эндометрия [18], кожи [25] и периодонта [19]. У мышей SP была обнаружена в мышечной ткани, мозге, молочной железе, печени, коже и яичках (подробнее см. [7]). Клетки SP составляли от 0,1 до 3,0% и проявляли свойства, присущие стволовым клеткам, хотя не во всех исследованиях оценивалась функция стволовых клеток *in vivo*. Следует также отметить, что SP во многих тканях/органах, например, в сердечной мышце [51], представляет собой достаточно разнородную популяцию и помимо стволовых клеток может включать клетки-предшественники разной степени дифференцировки. Однако во многих тканях/органах, например, в почках, кишечнике, поджелудочной железе, стволовые клетки до сих пор невозможно выделить с помощью антител к поверхностным маркерам, поэтому использование SP может представлять удачную стратегию.

ТАБЛИЦА 1. СРАВНЕНИЕ СПОСОБНОСТИ КЛЕТОК SIDE POPULATION И ОБЩЕЙ ПОПУЛЯЦИИ КОСТНОГО МОЗГА ОБРАЗОВЫВАТЬ КОЛОНИИ КРОВЕТВОРНЫХ КЛЕТОК *IN VITRO*

Тип клеток (количество посеянных клеток в 1 мл)	Колониеобразующие единицы (CFU)*						Обогащение
	N	GM	GEMM	BFU-E	Все колонии	Колонии/ количество посеянных клеток	
Клетки SP (100)	7	23,5±9,1	8,5±2,7	3,6±2,1	35,6±9,9	1/3,2	x80
Общая популяция костного мозга (20 000)	5	45,7±2,3	18,7±3,1	13,7±5,9	78,0±5,2	1/256,4	

Примечания. Клетки костного мозга и SP культивировались в растворе Methylcellulose MethoCult 3434 («Stem Cell Technologies», Канада), содержащем 3 У/мл эритропоэтина, 10 нг/мл IL-3, 10 нг/мл IL-6 и 50 нг/мл Stem cell factor. Через 12 дней культивирования подсчитывали колонии, содержащие более 50 клеток. N – количество экспериментов. Виды колоний: GM – гранулоцитарно-макрофагальные; GEMM – гранулоцитарные, эритроидные, макрофагальные, мегакариоцитарные; BFU-E – эритроидные; * – величины – mean±SD.

SP в злокачественных опухолях

Интерес к изучению SP в опухолевых клетках во многом связан с ростом популярности гипотезы стволовых раковых клеток (cancer stem cells). Согласно этой гипотезе, возникновение, развитие и прогрессирование опухоли связано с небольшой популяцией раковых клеток, обладающих свойствами стволовых, т.е. способных к самовоспроизведению и поддержанию опухолевой массы [30]. Гипотеза базировалась на работах группы J. Dick [45], доказавших существование лейкозной стволовой клетки [3], и предполагала наличие подобных клеток в других видах опухолей. Для выявления раковых стволовых клеток применялись те же стратегии, которые успешно использовались для выделения нормальных стволовых клеток, в том числе и метод с окрашиванием Hoechst.

В большинстве опубликованных работ SP изучалась на опухолевых клеточных линиях, где доля этой популяции варьировала от 0 до 20% [49]. Было показано, что клетки SP поддерживают онкогенные свойства в клеточных линиях. Так, в клеточной линии глиомы C6 только клетки SP были способны инициировать развитие опухоли и воссоздавать полный опухолевый фенотип, включающий и SP, и не-SP-клетки, что свидетельствовало о наличии у SP-клеток ключевых свойств стволовых клеток — способности к самовоспроизведению и дифференцировке [24]. Кроме того, только SP-клетки были способны формировать нейросферы, что является одним из важных признаков нейрональных стволовых клеток, и дифференцироваться в нейрональные линии. Похожие результаты были получены в опытах на линии клеток MCF-7 рака молочной железы [8], линии A549 рака легкого [35], нескольких линиях гепатоклеточной карциномы [32] и SW480 линии рака кишечника [11]. В этих экспериментах была показана возможность единичных клеток SP формировать колонии, а в некоторых случаях инициировать развитие опухоли *in vivo*. Однако следует отметить, что четкую взаимосвязь между процентным содержанием SP клеток и интенсивностью опухолевого роста или степенью агрессивности опухоли выявить не удалось. Кроме того, SP удалось обнаружить не во всех опухолевых линиях клеток, а в линиях HT29, HGT101, Caco2 и HRA19a1.1 рака кишечника SP и не-SP-клетки экспрессировали одинаковый набор поверхностных маркеров и проявляли одинаковую способность образовывать колонии *in vitro* и инициировать развитие опухоли *in vivo* [4]. Такие данные свидетельствуют о том, что клетки SP, видимо, не обладают исключительной способностью поддерживать рост опухолевых линий *in vitro*.

SP удалось выявить и в некоторых первичных опухолях, хотя таких работ до сих пор крайне мало. Сложность использования метода при ана-

лизе первичного материала от раковых пациентов заключается в том, что для выбора оптимальных условий выявления SP необходимо проведение тестовых анализов, требующих достаточно большого количества клеток, а количество материала, получаемого для экспериментов, бывает по объективным причинам нередко ограничено. Тем не менее, показано присутствие SP в первичных нейробластомах [14], раке яичника [36], легких [15] и в нескольких мезенхимальных опухолях [50]. В последних удалось выявить взаимосвязь между стадией опухоли и процентным содержанием SP. Таким образом, по крайней мере в определенных типах опухолей содержание SP может являться важным прогностическим критерием.

Интересно отметить, что SP выявлялась в первичных мезенхимальных опухолях, например, остеосаркоме, но отсутствовала в клеточных линиях остеосаркомы SaOS и U2OS [14]. Такое различие может объясняться тем, что клеточные линии часто не отражают реальное развитие опухолей *in vivo*. В частности, условия культивирования клеточных линий могут не соответствовать условиям *in vivo*, необходимым для поддержания SP. Например, для сохранения SP в клеточной линии глиомы C6 [24] было необходимо культивировать клетки в бессывороточной среде с добавлением факторов роста фибробластов (FGF и bFGF). Кроме того, остеосаркомы характеризуются выраженной разнородностью кариотипов клеток в пределах одной опухоли и между разными опухолями [12], тогда как клеточные линии гораздо более однородны. Подобные различия могут также влиять на формирование SP.

Отдельно следует заметить, что в последние годы появились работы [20, 52], в том числе в нашей лаборатории [44], подвергающие сомнению существование и ключевую роль стволовых раковых клеток и критикующие гипотезу в целом [1, 13, 21]. Однако, даже если SP не является маркером клеток, инициирующих канцерогенез, она представляет интерес как популяция клеток, которая может быть более устойчивой к лекарственной противоопухолевой терапии вследствие высокой активности транспортных белков ABC.

Список литературы

1. Adams J.M., Strasser A. Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones? // *Cancer Res.* — 2008. — Vol. 68. — P. 4018-4021.
2. Arai F., Hirao A., Ohmura M., Sato H., Matsuo S., Takubo K., Ito K., Koh G.Y., Suda T. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche // *Cell.* — 2004. — Vol. 118. — P. 149-161.
3. Bonnet D., Dick J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from

- a primitive hematopoietic cell // *Nat. Med.* – 1997. – Vol. 3. – P. 730-737.
4. Burkert J., Otto W.R., Wright N.A. Side populations of gastrointestinal cancers are not enriched in stem cells // *J. Pathol.* – 2008. – Vol. 214. – P. 564-573.
 5. Cabana R., Frolova E.G., Kapoor V., Thomas R.A., Krishan A., Telford W.G. The minimal instrumentation requirements for Hoechst side population analysis: stem cell analysis on low-cost flow cytometry platforms // *Stem Cells.* – 2006. – Vol. 24. – P. 2573-2581.
 6. Camargo F.D., Chambers S.M., Drew E., McNagny K.M., Goodell M.A. Hematopoietic stem cells do not engraft with absolute efficiencies // *Blood.* – 2006. – Vol. 107. – P. 501-507.
 7. Challen G.A., Little M.H. A side order of stem cells: the SP phenotype // *Stem Cells.* – 2006. – Vol. 24. – P. 3-12.
 8. Engelmann K., Shen H., Finn O.J. MCF7 side population cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the tumor antigen MUC1 // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68. – P. 2419-2426.
 9. Goodell M.A., Brose K., Paradis G., Conner A.S., Mulligan R.C. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo // *J. Exp. Med.* – 1996. – Vol. 183. – P. 1797-1806.
 10. Goodell M.A., Rosenzweig M., Kim H., Marks D.F., DeMaria M., Paradis G., Grupp S.A., Siff C.A., Mulligan R.C., Johnson R.P. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species // *Nat. Med.* – 1997. – Vol. 3. – P. 1337-1345.
 11. Haraguchi N., Utsunomiya T., Inoue H., Tanaka F., Mimori K., Barnard G.F., Mori M. Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system // *Stem Cells.* – 2006. – Vol. 24. – P. 506-513.
 12. Hiddemann W., Roessner A., Wormann B., Mellin W., Klockenkemper B., Bosing T., Buchner T., Grundmann E. Tumor heterogeneity in osteosarcoma as identified by flow cytometry // *Cancer.* – 1987. – Vol. 59. – P. 324-328.
 13. Hill R.P. Identifying cancer stem cells in solid tumors: case not proven // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66. – P. 1891-1895; discussion 1890.
 14. Hirschmann-Jax C., Foster A.E., Wulf G.G., Nuchtern J.G., Jax T.W., Gobel U., Goodell M.A., Brenner M.K. A distinct «side population» of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2004. – Vol. 101. – P. 14228-14233.
 15. Ho M.M., Ng A.V., Lam S., Hung J.Y. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67. – P. 4827-4833.
 16. Jonker J.W., Freeman J., Bolscher E., Musters S., Alvi A.J., Titley I., Schinkel A.H., Dale T.C. Contribution of the ABC transporters Bcrp1 and Mdr1a/1b to the side population phenotype in mammary gland and bone marrow of mice // *Stem Cells.* – 2005. – Vol. 23. – P. 1059-1065.
 17. Julius M.H., Masuda T., Herzenberg L.A. Demonstration that antigen-binding cells are precursors of antibody-producing cells after purification with a fluorescence-activated cell sorter // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1972. – Vol. 69. – P. 1934-1938.
 18. Kato K., Yoshimoto M., Kato K., Adachi S., Yamayoshi A., Arima T., Asanoma K., Kyo S., Nakahata T., Wake N. Characterization of side-population cells in human normal endometrium // *Hum. Reprod.* – 2007. – Vol. 22. – P. 1214-1223.
 19. Kawanabe N., Murakami K., Takano-Yamamoto T. The presence of ABCG2-dependent side population cells in human periodontal ligaments // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – Vol. 344. – P. 1278-1283.
 20. Kelly P.N., Dakic A., Adams J.M., Nutt S.L., Strasser A. Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells // *Science.* – 2007. – Vol. 317. – P. 337.
 21. Kern S.E., Shibata D. The fuzzy math of solid tumor stem cells: a perspective // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67. – P. 8985-8988.
 22. Kobayashi I., Moritomo T., Ototake M., Nakanishi T. Isolation of side population cells from ginbuna carp (*Carassius auratus langsdorffii*) kidney hematopoietic tissues // *Dev. Comp. Immunol.* – 2007. – Vol. 31. – P. 696-707.
 23. Kondo M., Wagers A.J., Manz M.G., Prohaska S.S., Scherer D.C., Beilhack G.F., Shizuru J.A., Weissman I.L. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application // *Annu. Rev. Immunol.* – 2003. – Vol. 21. – P. 759-806.
 24. Kondo T., Setoguchi T., Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol. 101. – P. 781-786.
 25. Larderet G., Fortunel N.O., Vaigot P., Cegalerba M., Maltere P., Zobiri O., Gidrol X., Waksman G., Martin M.T. Human side population keratinocytes exhibit long-term proliferative potential and a specific gene expression profile and can form a pluristratified epidermis // *Stem Cells.* – 2006. – Vol. 24. – P. 965-974.
 26. Lechner A., Leech C.A., Abraham E.J., Nolan A.L., Habener J.F. Nestin-positive progenitor cells derived from adult human pancreatic islets of Langerhans contain side population (SP) cells defined by expression of the ABCG2 (BCRP1) ATP-binding cassette transporter // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. – Vol. 293. – P. 670-674.
 27. Martin C.M., Meeson A.P., Robertson S.M., Hawke T.J., Richardson J.A., Bates S., Goetsch S.C., Gallardo T.D., Garry D.J. Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart // *Dev. Biol.* – 2004. – Vol. 265. – P. 262-275.
 28. Maximow A. Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der

Säugefiere // Sitzungsber. Berl. Hämatol. Gesellsch. – 1910. – Vol. 10. – P. 86-95.

29. Montanaro F., Liadaki K., Schienda J., Flint A., Gussoni E., Kunkel L.M. Demystifying SP cell purification: viability, yield, and phenotype are defined by isolation parameters // *Exp. Cell Res.* – 2004. – Vol. 298. – P. 144-154.

30. Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells // *Nature.* – 2001. – Vol. 414. – P. 105-111.

31. Sales-Pardo I., Avendano A., Martinez-Munoz V., Garcia-Escarp M., Celis R., Whittle P., Barquinero J., Domingo J.C., Marin P., Petriz J. Flow cytometry of the Side Population: tips & tricks // *Cell Oncol.* – 2006. – Vol. 28. – P. 37-53.

32. Shi G.M., Xu Y., Fan J., Zhou J., Yang X.R., Qiu S.J., Liao Y., Wu W.Z., Ji Y., Ke A.W., Ding Z.B., He Y.Z., Wu B., Yang G.H., Qin W.Z., Zhang W., Zhu J., Min Z.H., Wu Z.Q. Identification of side population cells in human hepatocellular carcinoma cell lines with stepwise metastatic potentials // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* – 2008.

33. Simpson C., Pearce D.J., Bonnet D., Davies D. Out of the blue: a comparison of Hoechst side population (SP) analysis of murine bone marrow using 325, 363 and 407 nm excitation sources // *J. Immunol. Methods.* – 2006. – Vol. 310. – P. 171-181.

34. Spangrude G.J., Heimfeld S., Weissman I.L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells // *Science.* – 1988. – Vol. 241. – P. 58-62.

35. Sung J.M., Cho H.J., Yi H., Lee C.H., Kim H.S., Kim D.K., Abd El-Aty A.M., Kim J.S., Landowski C.P., Hediger M.A., Shin H.C. Characterization of a stem cell population in lung cancer A549 cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2008. – Vol. 371. – P. 163-167.

36. Szotek P.P., Pieretti-Vanmarcke R., Masiakos P.T., Dinulescu D.M., Connolly D., Foster R., Dombkowski D., Preffer F., Maclaughlin D.T., Donahoe P.K. Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – Vol. 103. – P. 11154-11159.

37. Telford W.G., Bradford J., Godfrey W., Robey R.W., Bates S.E. Side population analysis using a violet-excited cell-permeable DNA binding dye // *Stem Cells.* – 2007. – Vol. 25. – P. 1029-1036.

38. Telford W.G., Frolova E.G. Discrimination of the Hoechst side population in mouse bone marrow with violet and near-ultraviolet laser diodes // *Cytometry A.* – 2004. – Vol. 57. – P. 45-52.

39. Till J.E., McCulloch E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells // *Radiat. Res.* – 1961. – Vol. 14. – P. 213-222.

40. Tsinkalovsky O., Filipski E., Rosenlund B., Sothorn R.B., Eiken H.G., Wu M.W., Claustrat B., Bayer J., Levi F., Laerum O.D. Circadian expression of clock genes in purified hematopoietic stem cells is developmentally regulated in mouse bone marrow // *Exp. Hematol.* – 2006. – Vol. 34. – P. 1249-1261.

41. Tsinkalovsky O., Rosenlund B., Laerum O.D., Eiken H.G. Clock gene expression in purified mouse hematopoietic stem cells // *Exp. Hematol.* – 2005. – Vol. 33. – P. 100-107.

42. Tsinkalovsky O., Vik-Mo A.O., Ferreira S., Laerum O.D., Fjose A. Zebrafish kidney marrow contains ABCG2-dependent side population cells exhibiting hematopoietic stem cell properties // *Differentiation.* – 2007. – Vol. 75. – P. 175-183.

43. Venezia T.A., Merchant A.A., Ramos C.A., Whitehouse N.L., Young A.S., Shaw C.A., Goodell M.A. Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells // *PLoS Biol.* – 2004. – Vol. 2. – P. e301.

44. Wang J., Sakariassen P.O., Tsinkalovsky O., Immervoll H., Boe S.O., Svendsen A., Prestegarden L., Rosland G., Thorsen F., Stuhr L., Molven A., Bjerkvig R., Enger P.O. CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells // *Int. J. Cancer.* – 2008. – Vol. 122. – P. 761-768.

45. Wang J.C., Dick J.E. Cancer stem cells: lessons from leukemia // *Trends Cell Biol.* – 2005. – Vol. 15. – P. 494-501.

46. Weissman I.L. The road ended up at stem cells // *Immunol. Rev.* – 2002. – Vol. 185. – P. 159-174.

47. Weissman I.L. Normal and neoplastic stem cells // *Novartis Found Symp.* – 2005. – Vol. 265. – P. 35-50; discussion 50-34, 92-37.

48. Weissman I.L., Anderson D.J., Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2001. – Vol. 17. – P. 387-403.

49. Wu C., Alman B.A. Side population cells in human cancers // *Cancer Lett.* – 2008.

50. Wu C., Wei Q., Utomo V., Nadesan P., Whetstone H., Kandel R., Wunder J.S., Alman B.A. Side population cells isolated from mesenchymal neoplasms have tumor initiating potential // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67. – P. 8216-8222.

51. Yamahara K., Fukushima S., Coppin S.R., Felkin L.E., Varela-Carver A., Barton P.J., Yacoub M.H., Suzuki K. Heterogeneous nature of adult cardiac side population cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2008. – Vol. 371. – P. 615-620.

52. Zheng X., Shen G., Yang X., Liu W. Most C6 cells are cancer stem cells: evidence from clonal and population analyses // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67. – P. 3691-3697.

53. Zhou S., Schuetz J.D., Bunting K.D., Colapietro A.M., Sampath J., Morris J.J., Lagutina I., Grosveld G.C., Osawa M., Nakauchi H., Sorrentino B.P. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype // *Nat. Med.* – 2001. – Vol. 7. – P. 1028-1034.

поступила в редакцию 06.05.2008
принята к печати 27.05.2008