

Присвоение дистрофина с использованием человеческого эндотелия, экспрессирующего HLA-E, у мышиной модели мышечной дистрофии Дюшенна без иммуносупрессии.

ВВЕДЕНИЕ

Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) является тяжелой, рецессивной Х-хромосомой формой мышечной дистрофии, характеризующейся быстрым прогрессированием дегенерации мышц, что в конечном итоге приводит к потере в способности ходить, параличу и смерти. Расстройство вызвано мутацией в гене, кодирующем дистрофин, важный структурный компонент мышечной ткани. Отсутствие дистрофина приводит к дестабилизации внеклеточной архитектуры мембраны, что делает мышечные волокна чувствительными к сжатию, ассоциированному с механической нагрузкой, и дегенерации. Скелетные мышцы вырождаются постепенно и необратимо и заменяются фиброзными тканями (1). Несколько протоколов были разработаны для клеточной терапии, особенно с использованием модели MDX мыши (2,3).

Там нет никакого известного лечения для пациентов с МДД. Однако использование стволовых клеток или клеток-предшественников миогенных обладает значительным потенциалом в качестве эффективного и подходящего лечения. Миобласты представляют естественный первый выбор для клеточной терапии скелетных мышц. Тем не менее, миобласты после мышечной биопсии плохо растут в пробирке и быстро стареют (1). Клетки с миогенным потенциалом присутствуют во многих других тканях, и эти клетки легко образуют скелетные мышцы при благоприятных условиях культивирования (4). Экспериментальные подходы к МДД с использованием животных моделей также широко исследованы, используя клетки, полученные из костного мозга (7), синовиальной мембраны (8) и менструальной крови (9).

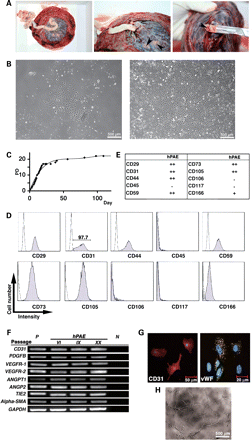
При любой клеточной терапии донорские клетки часто отвергается реципиентом при трансплантации в аллогенной комбинации. Отторжение обусловлено несоответствием человеческого лейкоцитарного антигена (HLA). Есть большое количество различных аллелей каждого HLA, но идеальное совпадение всех HLA между донорскими клетками и клетками-хозяев крайне редко. HLA-E, вместе с HLA-G и HLA-F, является молекулами неклассического главного комплекса гистосовместимости класса I (MHC Ib) (10), который играет важную роль в иммуносупрессии. Среди молекул Ib, HLA-E обладает ограниченным паттерном экспрессии в различных типах клеток (11) и является лигандом CD94/NKG2 рецепторов (12,13). Взаимодействие HLA-E с CD94/NKG2 рецепторами принимает участие в ингибировании естественных киллеров (NK) и цитотоксических Т-лимфоцитов (12,14). Маточно-плацентарная иммунная система использует эту иммуносупрессию через производство HLA-E, HLA-F и HLA-G в матке и плаценте. В этом исследовании, мы исследовали иммуномодулирующее действие HLA (класс Ib) в ксеногенной комбинации, используя клетки плаценты, экспрессирующие HLA-E. Клетки эндотелия артерий плаценты человека (hPAE) предоставляют дистрофин в миоцитах 'иммунокомпетентных' MDX мышей, модели МДД, делает это с чрезвычайно высокой эффективностью.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Вывод hPAE клеток.

Мы успешно культивировать большое количество hPAE клеток, полученных из артерий плаценты пяти доноров методом эксплантов культуры (фиг.1А; см. Материалы и методы). hPAE клетки эндотелия (рис. 1б) культивированы на платинах. Они продолжали размножаться, пока PD 17 на 20-й день (рис. 1в). Клеточный пролиферативный потенциал оценивали путем расчета общего количество (уровень ПД или накопительные PDS) с помощью формулы log10 (общее число клеток / начальное количество клеток) / log 10 2. Цитометрический анализ показал, что hPAE клетки были положительны для CD29 (интегрину b1), CD31 (РЕСАМ-1), CD44 (Pgp-1/ly24), CD59, CD73, CD105 и CD166 (ALCAM) и отрицательный для CD45, CD106 (VCAM-1) и CD117 (с-Kit) (рис. . 1D и Е). Почти все клетки были положительными для маркера эндотелия CD31 (97,7%), подразумевая, что клетки были эндотелиального происхождения. Анализ ОТ- ПЦР показал, что hPAE клетки экспрессируют эндотелиальные маркеры (рис. 1F). Иммуноцитохимический анализ также показал, что клетки hPAE были положительны для CD31 и фактора фон Виллебранда (ФВ) (рис. 1G). Мы проверяли, действительно ли hPAE клетки будут образовывать " сеть ангиогенеза " при посеве на матригель. Как показано на рис 1H, культура клеток hPAE внеклеточного матрикса приводит к образованию сосудистой трубки в течение 6 часов. hPAE клетки с образованием сосудистой трубки были иммуноцитохимически положительным для фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) (Дополнительный материал, рис. S1).

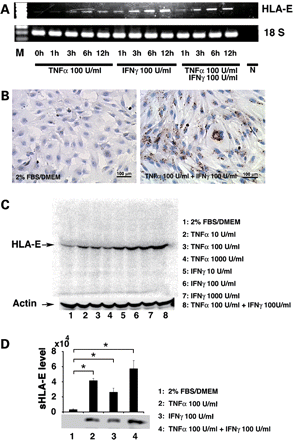
Рисунок 1



Экспрессия HLA-E в hPAE клетках.

Так как неклассический MHC участвует в иммунной привилегии (10,15), мы исследовали, могут ли hPAE клетки продуцировать HLA-E после воздействия цитокинов (16). hPAE клетки начали выражать HLA-E после воздействия цитокинов на уровне транскрипции (рис. 2) и уровне белка (рис. 2В и C). Иммуное окрашивание показало, что HLA-E в основном локализованы в цитоплазме (рис. 2В, справа). Вестерн-блот-анализ с использованием анти-HLA-E-специфических моноклональных антител показал единственную полосу в 42 кДа, в соответствии с молекулярной массой HLA-E белка (рис. 2в). Анализ иммунопреципитации клеточного супернатанта показал единственную полосу при 37 кДа, в соответствии с молекулярной массой растворимого -E (Шла-E) белка (фиг. 2D), подразумевая, что HLA -E секретируется.

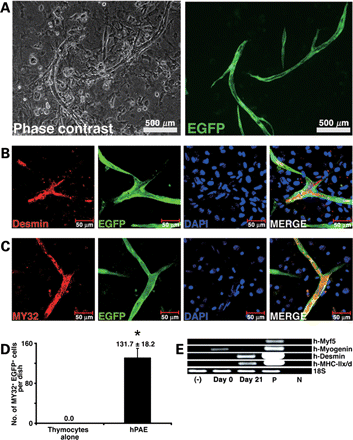
Рисунок 2



Миогенная индукция hPAE клеток в пробирке.

Затем мы исследовали способны ли hPAE клетки дифференцироваться в скелетные миоциты в пробирке (рис. 3). hPAE клетки начали дифференцироваться в многоядерные мышечные трубки в культуре после индукции (рис. 3А). Иммуноцитохимия указала, что усиливается сигнал зеленого флуоресцентного белка (EGFP), которым метили многоядерные мышечные трубки на наличие десмина (рис. 3В) и тяжелой цепи миозина (рис. 3C и D). Миогенез из hPAE клеток был также проанализирован на ОТ-ПЦР с праймерами, которые могут усилить миогенные гены человека, но не мыши. hPAE клетки экспрессируют ген миогенина и начали экспрессировать десмин и MyHC-IIx после индукции (рис. 3Е). Мы также провели вестерн блот для кислой фосфатазы остеокластов, щелочной фосфатазы для остеобластов и для адипоцитов hPAE клеток на 21 день после начала культивирования (Дополнительный материал, рис. S2).

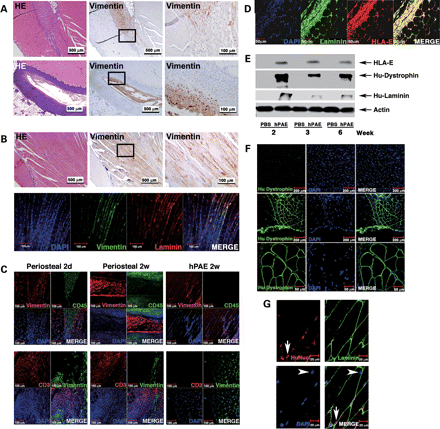
Рисунок 3



Прямая имплантация hPAE клеток у иммунокомпетентных BALB / с мышей.

Для дальнейшей оценки ответа hPAE клеток в естественных условиях, клетки непосредственно вводится в бедренную мышцу иммунокомпетентной линии BALB / C мышей (17). Для сравнения, клетки надкостницы с низкой экспрессией HLA-E вводили таким же образом. Гистопатологический анализ показал, что инъекция периостальных клеток индуцировала иммунный ответ (рис. 4а), но hPAE клетки не делалали этого(рис. 4б), предполагая, что hPAE клетки не вызывают про-воспалительных реакций у иммунокомпетентных мышей. Иммуногистохимический анализ, с использованием антител, характерных для человека виментина, показал, что клетки hPAE широко мигрировали между мышечными волокнами (рис. 4б). Иммунофлуоресцентный анализ показал, что CD45 и CD3 лимфоциты проникли около (донор) надкостничных клеток через 2 дня после инъекции в линии BALB / C мышц, а количество лимфоцитов увеличилось через 2 недели (фиг. 4C). В противоположность этому, CD45-и CD3-позитивные клетки не были обнаружены вокруг виментин-положительных клеток hPAE через 2 недели. Мы также провели иммунофлуоресцентный и вестерн-блотт анализ, чтобы исследовать экспрессию HLA-E в естественных условиях. hPAE клетки экспрессировали HLA-E в мышечных тканях (рис. 4D и E). Кроме того, экспрессия HLA-E остается неизменной на протяжении 6 недель. Затем мы рассмотрели интерлейкин-4 (IL-4), который имеет важное значение для трансплантации. ИЛ-4 производство достигло максимального уровня после 2 недель , а затем снизилась (Дополнительный материал, рис. S3).

Рисунок 4

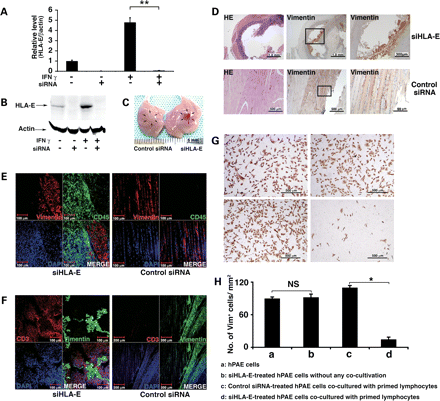


Чтобы исследовать, могут ли клетки hPAE генерировать мышечную ткань в живом организме, hPAE клетки были имплантированы непосредственно в правое бедро BALB / с мышей, с фосфатно-солевом буфером (PBS), введенным в контралатеральную мышцу в качестве контроля. Иммуногистохимическое исследование проводили с помощью человек-специфических антител через 3 недели после инъекции. Не было положительной реакции обнаруженной в мышцах BALB / с мышей без клеточной имплантации (одна PBS) (рис. 4E и F; Дополнительный материал, рис S4.). Эти результаты означают, что дистрофин транскрибируется с гена дистрофина человеческих клеток доноров после hPAE клетки дифференцируются в мышечные трубки и сливаются для размещения миоцитов без иммунного ответа. Чтобы определить, вызвана ли экспрессия человеческого дистрофина в донорских клетках слиянием, иммуногистохимия с антителами против человеческих ядер (Ab-HuNucl) и 4 ',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) была выполнена. Мы рассмотрели почти все 7 мм серийные гистологические срезы (сечение) из мышечных тканей с помощью конфокальной микроскопии и обнаружили, что миоциты имели ядра, полученные из человеческих и мышиных клеток (рис. 4G ), подразумевая, что выражение дистрофина приписывается слиянию между мышиными миоцитами и донорскими клетками человека.

Торможение HLA-E на малых интерферирующих РНК (миРНК).

Для исследования участия HLA-E в иммуносупрессии, мы подавляли экспрессию HLA-E на миРНК в hPAE клетках. Значительное снижение HLA-E мРНК наблюдалась в клетках, трансфицированных HLA-E миРНК (СIHLA-E) по сравнению с контрольными клетками (рис. 5а). В той же серии экспериментов, HLA-E белок значительно уменьшилcz в CIHLA-E-трансфецированных клетrках по сравнению с контрольными клетками (рис. 5б). Для исследования участия HLA-E в естественных условиях иммунного ответа, после предварительной обработки с 20 мкм СIHLA-E в течение 48 ч, hPAE клетки вводили в мышцы бедра иммунокомпетентных BALB / с мышей(рис. 5C-F). Гистологическое исследование показало, что инъекции СIHLA-E-обработанных клеток hPAE вызывали иммунный ответ, как показала инфильтрация CD3-и CD45-позитивных лимфоцитов в иммунокомпетентных BALB / с мышей через 7 дней после инъекции, тогда как инъекция контроля миРНК обработанных клеток hPAE не показала инфильтрации (фиг. 5E и F). Это предполагает, что HLA-E необходим для ингибирования иммунной реакции в естественных условиях.

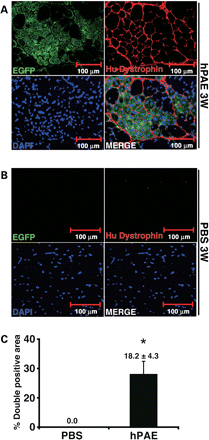
Рисунок 5



Присвоение человеческого дистрофина при имплантации у MDX мышей.

Чтобы исследовать вопрос о том, как hPAE клетки могут передать человеческий дистрофин в миоциты, необработанные EGFP-меченые клетки были имплантированы непосредственно в бедренную мышцу MDX мышей (рис. 6а). PBS вводили в противоположную мышцу в качестве контроля (фиг.6В). В течение 3-х недель после имплантации, человеческий дистрофин был обнаружен в EGFP-позитивных мышечных трубках в качестве кластера в 18,2% (рис. 6). Экспрессия дистрофина не была вызвана возвратом к нормальному фенотипу миоцитов у MDX мышей, поскольку антитела, используемые в данном исследовании, является специфическим для человека. Эти результаты показывают, что человеческий дистрофин транскрибируется с гена дистрофина клеток-доноров человека.

Рисунок 6



ОБСУЖДЕНИЕ

МДД является разрушительным, связанным с Х-хромосомой, мышечным заболеванием, которое характеризуется прогрессирующей мышечной слабостью из-за отсутствия экспрессии дистрофина в сарколемме мышечных волокон (18). Так в настоящее время нет эффективных терапевтических подходов к мышечной дистрофии. hPAE клетки имеют высокую репликативную способность, подобную предшественникам или стволовым клеткам, которые имеют долгосрочный потенциал самообновления, и имели намного более высокие темпы роста в наших экспериментальных условиях, чем стромальные клетки мозга (19). Иммуносупрессивные hPAE клетки с прямым миогенным потенциалом, таким образом, имеют значительный потенциал для эффективной и устойчивой клеточной терапии. Функция HLA-E была выяснена через его взаимодействия с CD94-NKG2 рецепторами, экспрессируемыми NК-клетками и подмножеством Т-клеток (12,13). В пробирке исследования с использованием человеческих клеток позволили получить данные об участии HLA-E в негативных сигналах иммунных реакций (20). Qa-1 (гомологичные HLA-E у мышей)-дефицитных мышей имеют дефекты в иммунорегуляции, опосредованные Т-клетками (21). Выживание донорских клеток у иммунокомпетентных мышей объясняется, по крайней мере частично, HLA-E-зависимой иммуносупрессией, потому что эксперименты по блокаде HLA-E ясно показывают вовлечение HLA-E в клеточно-опосредованный лизис клеток hPAE (рис. 5). HLA-E является защитным ответом hPAE клеток к травмам и играет важную роль в иммуносупрессии.

Следует отметить, что hPAE клетки, а также другие клетки плаценты, получают путем простой, безопасной и безболезненной процедуры, и большое количество hPAE клеток могут быть легко собраны из плацентарных артерий. В этом исследовании, мы вручную отделили хорионические крупные артерии от хорионической пластины, которая полностью покрывает поверхность плаценты, которая, в свою очередь, покрыта амнионом (рис. 1а). hPAE клетки размножаются, по меньшей мере PD 17 > 20 дней и прекращают делиться до PD 22. Прогнозируемое количество CD31-положительных hPAE клеток из одной плаценты средним размером (500 г) будет 1 \* 107, возможно, достигнув 1 \* 1012 после культивирования. Это может охватывать 30 000 см3 мышечной ткани в клеточной терапии (5). Клетки превращается в мышечные трубки в пробирке с высокой частотой после индукции, что приводит к большому количеству миофибрилл, экспрессирующих человеческий дистрофин при пересадке BALB / с и MDX мышам, таким образом выполняя все критерии, необходимые для успешной аллогенной клеточной терапии для мышечной дистрофии. По сравнению с ранее описанных экспериментах, в том числе от нашей лаборатории (9), частота мышечных трубок с человеческого дистрофина после имплантации клеток была очень высокой. Миогенин, транскрипционный фактор, определяет судьбу мышечных клеток и ускоряет слияние клеток, и конститутивно экспрессируется в hPAE клетках, подразумевая, что либо эти клетки имеют миогенный потенциал или что эти клетки являются миогенными предшественниками. Миогенезу также могут способствовать цитокины, такие как VEGF (22), а также факторы транскрипции. Кроме того, в случае клеточной терапии, так называемое "пространство" необходимое для выживания имплантированных донорских клеток. Облучение используется для генерации пространства в случаях трансплантации костного мозга. Токсин, который вызвает повреждение мышц и патофизиологическую ишемию мышечной ткани, а также может генерировать пространство в мышцах (23). BALB / C и MDX мышей использовали в этом исследовании, и почти идентичные результаты были получены от обоих типов мышей, хотя BALB / с мыши теоретически не имеют мышечной травмы. Высокая частота формирования дистрофин-положительных миотрубочек можно отнести к генерации пространства иммунного ответа после имплантации клеток в ксеногенной комбинации. hPAE клетки производят HLA-E после иммунореакции по производству иммуноцитокинов, таких как IL-4 (Дополнительный материал, рис. S1), а затем по индукции иммуносупрессии через HLA-E. Это иммунная реакция после клеточной имплантации возможно генерирует пространство для того, чтобы обеспечить выживание имплантированных клеток. Эта возможность достаточно благоприятна, потому что любая будущая терапия на основе клеток для пациентов с МДД будет использоваться в аллогенной комбинации. В противоположность этому, экспериментальные подходы были протестированы в сочетании сингенных, у иммунодефицитных мышей или через использование иммунодепрессантов. Клинические испытания на людях, с использованием аллогенной комбинации (5,6), ни в чем не уступают по сравнению с экспериментами с мышиными моделями. Это исследование может объяснить высокую частоту выживания донорских клеток наблюдаемых в клинических испытаниях.

Индукция иммуносупрессии через HLA-E от клеток hPAE, наблюдаемых в этом исследовании, непосредственно приводит к возможности клинической аллогенной клеточной терапии. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) или мезенхимальные клетки-предшественники, выделенные из костного мозга как (24), уже определены во многих тканях, в том числе пуповинной крови (25), плаценте (26), жировой ткани и амниотической жидкости (27). Они были использованы для клеточной терапии из-за их мощности самообновления и их способности образовывать кости, жир, хрящи, мышцы, кардиоциты и нейроны (28,29). Изоляция тканеспецифических стволовых клеток для экспансии в пробирке и трансплантации обратно в организм пациента является идеальной стратегией. Использование аутологичных МСК реструктурируют поврежденные ткани, но это имело некоторый клинический успех (30). В большинстве случаев дегенеративных и генетических заболеваний маловероятно, что достаточно неповрежденные стволовые клетки будут изолированы или имеется в достаточном количестве, что требует использования стволовых клеток из подходящих и рентабельных аллогенных источников, таких как плацента.

Ссылки

1. Cossu G., Mavilio F. Myogenic stem cells for the therapy of primary myopathies: wishful thinking or therapeutic perspective? J. Clin. Invest. 2000;105:1669-1674. CrossRef Search Google Scholar
2. Hoffman E.P., Brown R.H. Jr., Kunkel L.M. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. Cell 1987;51:919-928. CrossRefMedline Web of Science Search Google Scholar
3. Sicinski P., Geng Y., Ryder-Cook A.S., Barnard E.A., Darlison M.G., Barnard P.J. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. Science 1989;244:1578-1580. Abstract/FREE Full Text
4. Gerhart J., Bast B., Neely C., Iem S., Amegbe P., Niewenhuis R., Miklasz S., Cheng P.F., George-Weinstein M. MyoD-positive myoblasts are present in mature fetal organs lacking skeletal muscle. J. Cell Biol. 2001;155:381-392. Abstract/FREE Full Text
5. Skuk D., Goulet M., Roy B., Chapdelaine P., Bouchard J.P., Roy R., Dugre F.J., Sylvain M., Lachance J.G., Deschenes L., et al. Dystrophin expression in muscles of Duchenne muscular dystrophy patients after high-density injections of normal myogenic cells. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2006;65:371-386. Medline Web of Science Search Google Scholar 
6. Skuk D., Goulet M., Roy B., Piette V., Cote C.H., Chapdelaine P., Hogrel J.Y., Paradis M., Bouchard J.P., Sylvain M., et al. First test of a ‘high-density injection' protocol for myogenic cell transplantation throughout large volumes of muscles in a Duchenne muscular dystrophy patient: eighteen months follow-up. Neuromuscul. Disord. 2007;17:38-46. CrossRef Medline Web of Science Search Google Scholar
7. Dezawa M., Ishikawa H., Itokazu Y., Yoshihara T., Hoshino M., Takeda S., Ide C., Nabeshima Y. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. Science 2005;309:314-317. Abstract/FREE Full Text
8. De Bari C., Dell'Accio F., Vandenabeele F., Vermeesch J.R., Raymackers J.M., Luyten F.P. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. J. Cell Biol. 2003;160:909-918. Abstract/FREE Full Text
9. Cui C.H., Uyama T., Miyado K., Terai M., Kyo S., Kiyono T., Umezawa A. Menstrual blood-derived cells confer human dystrophin expression in the murine model of Duchenne muscular dystrophy via cell fusion and myogenic transdifferentiation. Mol. Biol. Cell 2007;18:1586-1594. Abstract/FREE Full Text
10. Carosella E.D., Paul P., Moreau P., Rouas-Freiss N. HLA-G and HLA-E: fundamental and pathophysiological aspects. Immunol. Today 2000;21:532-534. CrossRef Medline Web of Science Search Google Scholar
11. Ulbrecht M., Honka T., Person S., Johnson J.P., Weiss E.H. The HLA-E gene encodes two differentially regulated transcripts and a cell surface protein. J. Immunol. 1992;149:2945-2953. Abstract
12. Braud V.M., Allan D.S., O'Callaghan C.A., Soderstrom K., D'Andrea A., Ogg G.S., Lazetic S., Young N.T., Bell J.I., Phillips J.H., et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. Nature 1998;391:795-799. CrossRef Medline Search Google Scholar
13. Lee N., Llano M., Carretero M., Ishitani A., Navarro F., Lopez-Botet M., Geraghty D.E. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. Proc. Natl Acad. Sci. USA 1998;95:5199-5204. Abstract/FREE Full Text
14. Borrego F., Ulbrecht M., Weiss E.H., Coligan J.E., Brooks A.G. Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. J. Exp. Med. 1998;187:813-818. Abstract/FREE Full Text
15. Tsuji H., Miyoshi S., Ikegami Y., Hida N., Asada H., Togashi I., Suzuki J., Satake M., Nakamizo H., Tanaka M., et al. Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes. Circ. Res. 2010;106:1613-1623. Abstract/FREE Full Text
16. Coupel S., Moreau A., Hamidou M., Horejsi V., Soulillou J.P., Charreau B. Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation. Blood 2007;109:2806-2814. Abstract/FREE Full Text
17. Faustman D., Coe C. Prevention of xenograft rejection by masking donor HLA class I antigens. Science 1991;252:1700-1702. Abstract/FREE Full Text
18. Mendell J.R., Kissel J.T., Amato A.A., King W., Signore L., Prior T.W., Sahenk Z., Benson S., McAndrew P.E., Rice R., et al. Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. N. Engl. J. Med. 1995;333:832-838. CrossRef Medline Web of Science Search Google Scholar
19. Mori T., Kiyono T., Imabayashi H., Takeda Y., Tsuchiya K., Miyoshi S., Makino H., Matsumoto K., Saito H., Ogawa S., et al. Combination of hTERT and bmi-1, E6, or E7 induces prolongation of the life span of bone marrow stromal cells from an elderly donor without affecting their neurogenic potential. Mol. Cell. Biol. 2005;25:5183-5195. Abstract/FREE Full Text
20. Li J., Goldstein I., Glickman-Nir E., Jiang H., Chess L. Induction of TCR Vbeta-specific CD8+ CTLs by TCR Vbeta-derived peptides bound to HLA-E. J. Immunol. 2001;167:3800-3808. Abstract/FREE Full Text
21. Hu D., Ikizawa K., Lu L., Sanchirico M.E., Shinohara M.L., Cantor H. Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice. Nat. Immunol. 2004;5:516-523. CrossRef Medline Web of Science Search Google Scholar 
22. Bryan B.A., Walshe T.E., Mitchell D.C., Havumaki J.S., Saint-Geniez M., Maharaj A.S., Maldonado A.E., D'Amore P.A. Coordinated vascular endothelial growth factor expression and signaling during skeletal myogenic differentiation. Mol. Biol. Cell 2008;19:994-1006. Abstract/FREE Full Text
23. Darabi R., Gehlbach K., Bachoo R.M., Kamath S., Osawa M., Kamm K.E., Kyba M., Perlingeiro R.C. Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells. Nat. Med. 2008;14:134-143. CrossRef Medline Web of Science Search Google Scholar
24. Friedenstein A.J., Gorskaja J.F., Kulagina N.N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Exp. Hematol. 1976;4:267-274. Medline Web of Science Search Google Scholar
25. Bieback K., Kern S., Kluter H., Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Stem Cells 2004;22:625-634. CrossRef Medline Web of Science Search Google Scholar
26. In 't Anker P.S., Scherjon S.A., Kleijburg-van der Keur C., de Groot-Swings G.M., Claas F.H., Fibbe W.E., Kanhai H.H. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. Stem Cells 2004;22:1338-1345. CrossRef Medline Web of Science Search Google Scholar
27. In 't Anker P.S., Scherjon S.A., Kleijburg-van der Keur C., Noort W.A., Claas F.H., Willemze R., Fibbe W.E., Kanhai H.H. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. Blood 2003;102:1548-1549. FREE Full Text
28. Prockop D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science 1997;276:71-74. Abstract/FREE Full Text
29. Kohyama J., Abe H., Shimazaki T., Koizumi A., Nakashima K., Gojo S., Taga T., Okano H., Hata J., Umezawa A. Brain from bone: efficient ‘meta-differentiation' of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. Differentiation 2001;68:235-244. CrossRef Medline Web of Science Search Google Scholar
30. Horwitz E.M., Gordon P.L., Koo W.K., Marx J.C., Neel M.D., McNall R.Y., Muul L., Hofmann T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. Proc. Natl Acad. Sci. USA 2002;99:8932-8937. Abstract/FREE Full Text
31. Miyoshi H., Takahashi M., Gage F.H., Verma I.M. Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector. Proc. Natl Acad. Sci. USA 1997;94:10319-10323.

Оригинал статьи: <http://hmg.oxfordjournals.org/content/early/2010/11/08/hmg.ddq458.long>

Переведено проектом МОЙМИО: <http://www.mymio.org>

