

А. В. Єпіфанцев

ДІОКСИНИ ТА ЗДОРОВ'Я НАСЕЛЕННЯ

Підкреслена важливість фундаментальних та прикладних досліджень у галузі впливу діоксину та його похідних на здоров'я населення, його вкладу в загальне погіршення здоров'я.

Вивчений вплив "Agent Orange", що був використаний армією США у війні з В'єтнамом, на довгострокові наслідки для здоров'я уражених. Зроблені висновки щодо суттєвих патологій усіх органів та систем цієї категорії населення.

Сформульована теорія патогенезу під назвою "діоксинова хвороба".

Результати досліджень є важливими для розв'язання практичних проблем сучасної охорони здоров'я населення.

A. V. Epifantsev

DIOXINS AND HEALTH OF THE POPULATION

The global effects of environmental pollution with dioxins and related compounds (PCS, PCDDs, PCDFs, PCBs) its impact on health, medical and social well-being of people is gradually realized all over the world. The particular importance of fundamental and applied researches in this field for Russia is caused by threatening situation with dioxin pollution in many regions of the country, and high probability of these supercotoxics contribution in observable critical deterioration health of the population. The large-scale spraying of Agent Orange by the USA army during the chemical war has generated unique conditions for studying the dioxins influence on humans in Vietnam.

The comparative analysis of the health assessment of the people

exposed and non-exposed with dioxin has revealed the long-term health consequences of exposure. The data of clinical examination of the Vietnamese people (males, females, children) testify to existence of pathology, which is characterized by various and persistent lesions all the organs and systems (cardiovascular, respiratory, alimentary, nervous, excretory, musculoskeletal, reproductive etc. systems), by authentic differences of anthropometrical parameters and also by reduction of lifetime. The development of the general theory of pathogenesis of human intoxication with dioxins, so-called "the theory of biological intensification of primary dioxins activity or hyperplastic theory", was the result of theoretical generalization of the outcomes of the continuing study on the long-term medical consequences of chemical war in Vietnam, and also of other scientific publications

The results of the executed research and formulated general theory of pathogenesis of humans dioxins intoxication (the theory of biological intensification of primary dioxins activity or hyperplastic theory) have allowed to term the new kind of the pathology as a "dioxin disease".

The approbation of the results of the executed research has shown its ability to solve adequately the scientific and practical problems of public health services. In particular, the results have allowed to develop:

- classification of the long-term medical consequences of dioxin influence;
- methodology for categorizing and distinguishing the dioxin-exposed population by a level of health loss;
- requirements for complexes of treatment-and-prophylactic and rehabilitation measures for the population with the long-term medical consequences;
- organizational principles for system of medical and social examination and care of the population exposed to dioxins.

УДК. 615.275.4.015.4

ЛВ.Н.Залесский ,к.м.н.,*О.Б. Дынник ,к.м.н.,**
Е.Л.Левицкий, д.б.н.***

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ОЦЕНКИ КЛЕТОЧНЫХ ПРЕДИКТОРОВ И ПОИСКА БИОМАРКЕРОВ ПРОЦЕССОВ КАРДИО-, ГЕПАТО- И ГЕНОТОКСИЧНОСТИ

*Институт кардиологии им. Н.Д. Стражеско АМН Украины, Киев

**Медицинское научно-практическое объединение "Медстрой",
АТ ХК "Киевгорстрой", Украинский Допплеровский клуб, Киев

***Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины, Киев

Стволовые клетки (СК) — это низкодифференцированные клетки, сохраняющие потенциал к развитию в разных направлениях их дифференцировки, и отличающиеся двумя важнейшими особенностями:

способностью к воспроизводству себе подобных путем самообновления ("self-renewal"), а также инициацией начала роста и развития других типов клеток [1, 6]. Дифференцировка является процессом, посредством

которого клетки приобретают новые морфологические и функциональные характеристики [1]. Управление процессом дифференцировки *in vivo* осуществляется в соматических клетках последовательно от клеток-прекурсоров герменативного слоя на протяжении всего периода развития организма. Процессы интенсивной дифференцировки протекают в регенерирующих тканях и сохраняются в постнатальном онтогенезе, а также характерны для взрослых СК ("adult stem cells"). Самообновление и дифференцировка СК находятся в фокусе многочисленных исследований экспрессии профильных генов [2, 3].

Существуют две большие категории СК: эмбриональные и неэмбриональные (соматические). Плюрипотентные эмбриональные СК обнаружены в результате их выделения из так называемой внутренней клеточной массы ("inner cell mass") в периоде эмбрионального развития на стадии бластоцисты [4, 5]. Плюрипотентность клеток определяется их способностью давать начало клеткам экто-, эндо- и мезодермального происхождения. Эмбриональные СК, экспрессирующие различные маркеры (в частности, такие как Oct 4, SSEA 1) [6] способны к дифференцировке и представляют транскрипционный профиль ("embryon-

ic stemness") эмбриональных СК [2, 7]. Обнаружена способность эмбриональных СК человека к пластичности и к дифференцировке в соматические клетки — нейроны, гепатоциты, кардиомиоциты, клетки трофобласта и некоторые другие [8-12].

Взрослые СК (известные как мезенхимальные СК) или мультипотентные мезенхимальные прогениторные клетки (ММПК) являются низкодифференцированными клетками, которые содержатся в различных тканях организма и участвуют в поддержании тканевого гомеостаза и их репарационного профиля. Эти клетки — прекурсоры способны к дифференцировке во все типы клеток, однако не все типы СК организма обладают плюрипотентностью. ММПК служат исходной гомогенной популяцией клеток, способных к росту в клеточной культуре и дифференцировке во все типы клеток. Сохранение взрослых СК низкодифференцированными в клеточной культуре зависит от культуральных свойств (плотности посадки клеток, особенностей питательных сред и др.). Взрослые СК могут быть клетками костномозгового происхождения [13], а также источниками их возникновения являющимися мозгом [14, 15, 16], печенью [17], сердцем [18], скелетная мышца [19] и периферическая кровь [20]. Важнейшей особенностью взрослых СК является их мультипотентность — форма клеточного развития с единой линией дифференцировки [21]. Эти клетки экспрессируют CD 13, тканеспецифический антиген 1 (SSEA-1), Flk-1, Sea-1 и Thy-1, однако не экспрессируют такие поверхностные маркеры как CD 34, CD 44, CD 45, c-kit и MHC (I и II классов). Взрослые СК *in vitro* обладают способностью к дифференцировке в остеобласты, адипоциты, хондроциты, нейроны, кардиомиоциты и многие другие типы соматических клеток [22].

Поразительно благоприятные особенности СК для применения в токсикологических исследованиях обнаружены при сравнении их свойств с высокодифференцированными клетками организма человека, а именно: неограниченная способность к пролиферации, пластичность, сравнительно быстрая миграция в область поражения и конечная (терминальная) дифферен-

цировка в другие клетки. Поэтому создание модельных систем, содержащих СК, представляет многообещающую инновационную инициативу для получения достаточного количества стволовых клеток с целью оценки начальных стадий токсических реакций и проведения скрининга высокотоксических соединений. Например, СК миокардиального и печеночного происхождения могут стать рутинными моделями для осуществления отбора новых фармакологических препаратов при проведении процедур оценки степени их кардио- и гепатотоксичности в период предклинического изучения новых лекарственных средств. Сегодня эмбриональные СК животных уже стали частью рутинных методик оценки тератогенных эффектов [23-25], утвержденных Еврокомиссией по оценке валидных и альтернативных методик (ECVAM) [26, 27]. Биотехнологии на основе применения СК становятся новым инструментом для изучения особенностей механизмов побочного действия лекарственных препаратов, а также для выявления клеточных предикторов возникновения цитотоксических реакций и предупреждения их развития у человека. В аналитическом обзоре представлены данные современной литературы, отражающие возможности применения взрослых (соматических) и эмбриональных стволовых клеток для оценки СК-ассоциированных клеточных предикторов и поиска биомаркеров кардио-, гепато- и генотоксичности.

Применение стволовых (соматических) клеток в оценке кардиоцитотоксичности

Современные методики предклинического анализа кардиотоксичности лекарственных соединений отличаются недостаточной результативностью предикторной оценки и обладают определенными ограничениями. Например, телеметрия некоторых физиологических показателей у животных, в частности электрокардиограммы, которые дают представление о действии лекарственных соединений на электромеханическую функцию сердца, не всегда экономически оправдана и имеет субоптимальную чувствительность. С помощью применения *in vitro* метода электрофизиологичес-

кой оценки функционирования ионных каналов в клетках Пуркинье также не всегда достигается необходимая точность предикторной оценки кардиотропных эффектов лекарственных соединений.

Клеточная культура кардиомиоцитов человека явилась надежной модельной системой в токсикологии [18], однако ограничения доступности тканей сердца у здоровых доноров не позволяет получить достаточное исходное количество взрослых СК миокарда. Применение эмбриональных СК миокардиального происхождения открывает новые возможности скрининга фармакологических средств, побочным действием которых может явиться удлинение интервала QT на ЭКГ, что приводит к развитию проаритмогенных эффектов.

Сравнительно недавно функционально полноценные кардиомиоциты были получены в клеточной культуре в процессе дифференцировки эмбриональных СК миокардиального происхождения [28]. Эмбриональные СК человека (hESC-СМ) отличались направленной морфологией и экспрессией на своей поверхности рецепторных молекул, включая кардиальный α белок, предсердный LC-миозин, желудочковый LC-миозин, HC- α миозин, предсердный натрийуретический пептид, а также сердечные тропонины Т и I, ответственные за ритмические сокращения кардиомиоцитов. Однако результаты других исследований показали, что hESC-СМ-клетки являются функционально неполноценными, низкодифференцированными кардиомиоцитами, которые имеют ограниченные возможности развития в терминальной стадии дифференцировки.

Взрослые СК костного мозга оказались наиболее приемлемыми в качестве прекурсоров кардиомиоцитов *in vitro* [29]. При добавлении в среду культивирования мышечных мезенхимальных СК костного мозга 5-азациитидина обнаружена стимуляция процесса дифференцировки миокардиальных СК [29]. Обработка СК 5-азациитидином способствовала появлению миотубулярных структур (длиной до 3.000 μ m) в цитозоле и инициировала экспрессию молекулярных маркеров (кардиальный α -актин, LHC-миозин, кардиомиоцит специфические факторы тран-

скрипции, такие как GATA-4, TEF-1, MEG 2A, C и D). Кардиомиоцитоподобные стволовые клетки (производные мезенхимальных СК костного мозга) в клеточной культуре трансформировались в функционально зрелые клетки, которые обладали пейсмекерной активностью, характерной для пульсирующих сокращений клеток синусового узла, а также аналогичной графикой электрических сокращений миокарда желудочков. Это позволило при наличии надежного контроля терминальной стадии дифференцировки имплантировать специализированные СК в мышцу сердца [30-32]. Изменения функциональных свойств кардиомиоцитов *in vitro* (формирующихся в результате дифференцировки взрослых СК) под воздействием лекарственных соединений контролировали исследованиями проницаемости их мембран для ионов (K⁺, Na⁺), электрической активности, состоянием гомеостаза Ca²⁺ и выраженностью сократительных свойств клеток миокарда [31]. Такой подход позволил уточнить особенности ранних электрофизиологических изменений сердечной деятельности и усовершенствовать процесс скрининга эффективных фармакологических средств на предклиническом этапе их испытаний.

Оценка цитотоксичности с помощью гепатоцитоподобных стволовых клеток

Гепатоциты человека отличаются высоким уровнем экспрессии ферментов метаболизма лекарственных препаратов, благодаря чему могут быть использованы в молекулярно-генетических и токсикологических исследованиях [32-35].

В литературе мы не встретили сообщений о способности фетальных низкодифференцированных гепатоцитоподобных СК к финальной дифференцировке во взрослые печеночные клетки человека. Однако имеется значительное количество работ, посвященных трансформации СК в гепатоцитоподобные клетки из печеночных источников, включая поджелудочную железу [36], костный мозг [37], клетки крови [38]. Практически в каждом из этих сообщений подчеркивалось, что трансформированные клетки обладали характерными морфо-

функциональными особенностями гепатоцитов.

Сравнительно недавно обнаруженные мультипотентные СК в амниотической жидкости [39] оказались способными к росту в условиях клеточной культуры, включавшей добавки факторов роста (FGF) на 5-10% эмбриональной куриной сыворотке. В более специфических условиях роста, с добавлением дексаметазона, плаценти-ассоциированные СК начинали дифференцироваться в гепатоциты, что подтверждалось экспрессией на их поверхности эпителиальных цитокератинов 8 и 18, а также экспрессией специфических генов, контролирующих дифференцировку гепатоцитов, в частности альбумина (Alb) и альфа-1-антитрипсина (?1AT). Экспрессия маркеров дифференцировки гепатоцитоподобных СК вызывала координированную экспрессию гепатоцитозависимых факторов транскрипции (HNF1, HNF4) и генов C/EBP-семейства. Эти транскрипционные факторы сами являются маркерами дифференцировки и инициируют экспрессию функциональной активности гепатоцитов на терминальной её стадии. Несмотря на то, что даже незрелые гепатоциты экспрессировали Alb и α 1AT, экспрессия многих ферментов метаболизма лекарственных соединений была ограничена преимущественно зрелыми гепатоцитами. Гепатоцитоподобные клетки, производные плацентарных СК, экспрессируют многие гены семейства цитохромов, что подтверждает возможность индукции процесса в направлении терминальной стадии дифференцировки. Так, экспрессия P_xR и C_{ar}, CYP 1A1 и CYP 1A2, CYP 2A6 и CYP 2B6, CYP 2C8 и CYP 2C9, CYP 2D6, CYP 2E1 и CYP 3A4 была обнаружена в этих клетках с помощью микроциповой протеомной технологии и PCR-анализа [33, 35].

В целом, обнаружение функциональной активности зрелых гепатоцитов, сформированных в результате дифференцировки СК плаценты, подтвердило возможности их применения (наряду со взрослыми печеночными СК) в токсикологических исследованиях для анализа метаболизма лекарств, а также в программах клеточной терапии заболеваний печени.

Применение взрослых СК человека в оценке генотоксических эффектов

Анализ особенностей влияния физико-химических факторов мутагенеза — клеточных токсикантов на индукцию гибели клетки, тератогенез, канцерогенез, атерогенез, иммунотоксичность, нейротоксичность, а также на процессы преждевременного старения, болезни кожного и старческого возраста [16, 40, 41] требует уточнения механизмов регуляции клеточного гомеостаза, процессов пролиферации, дифференцировки апоптоза и старения. Низкодифференцированные взрослые СК, находящиеся во всех тканях организма, могут служить мишенями или иметь дифференциальную чувствительность по отношению к влиянию токсикантов *in vivo*. Поэтому в программы токсикологических исследований *in vivo* входит оценка влияния на взрослые СК мутагенных, токсических и эпигенетических факторов.

Наряду с подробным изучением механизмов токсикант-индуцированного мутагенеза и цитотоксичности редко осуществлялась оценка эпигенетических эффектов токсикантов. Оказалось, что токсикант-зависимые нарушения экспрессии генов, происходящие на транскрипционном (метилирование ДНК, ацетилирование гистонов), трансляционном (сплайсинг mРНК) или посттрансляционном (модифицированное фосфорилирование белков) уровнях, тормозили процессы роста и развития стволовых клеток (снижая их способность к пролиферации, дифференцировке, апоптотической гибели, адаптацию к действию факторов микроокружения), а также приводили к развитию процесса преждевременного старения [16, 41].

Альтеративные нарушения экспрессии генов взрослых СК человека имеют значительные токсикологические последствия, так как эти клетки обеспечивают прогени-торной "поддержкой" жизнеспособность всех органов и тканей, подвергаемых повреждающим влияниям или имеющих соответствующую степень "износа" в результате вовлечения в различные патологические процессы. Такие немутагенные и нетоксические соединения как талидомид и его производные способствуют развитию тератогенеза у человека с помощью эпигенетических механизмов действия. Фенобарби-

тал, лекарственный препарат, не обладающий генотоксическими свойствами, способствует развитию опухолевого процесса в печени грызунов. Фталаты могут индуцировать возникновение репродуктивных дисфункций. Потенциально опасные токсиканты способны дифференцированно вызывать мутации генов взрослых СК, апоптоз, а также — асимметричность процессов клеточного деления или дифференцировки по сравнению с симметричностью процесса самообновления клеток. Предложенное понятие клеточное микроокружение ("niche") включает клеточный матрикс, индукторы регуляции процессов межклеточной атрезии и внутриклеточной сигнализации [13]. При этом суммарный эффект влияния белковых регуляторов процесса внутриклеточной сигнализации СК определяется как состоянием их в покое, так и степенью вовлечения в процессы апоптоза и/или симметричного/асимметричного митоза.

Анализ возможностей использования в токсикологических исследованиях фармакологических соединений технологий молекулярной медицины, в частности ДНК-микрочипов, привело к установлению дифференциальной чувствительности к токсикантам различных типов СК *in vivo*. Каждый тип клеток отличается характерной экспрессией группы генов, а рост клеток на промежуточных этапах клеточного цикла контролируется отдельной группой "транзиторных" генов, а также "критических" генов апоптоза. Клонально обусловленный рост клеток аномальных тканей (опухлей или атеросклеротических бляшек) позволяет предположить возможности их возникновения из отдельных стволовых клеток при нарушении контроля со стороны "критических" генов механизмов мутагенеза или устойчивого эпигенетического развития [40]. Сокращение сообщества стволовых клеток может служить ответной реакцией на интенсивно развивающийся процесс преждевременного старения любого органа и, следовательно, организма в целом [41]. С появлением возможностей изолировать и пересаживать СК в другие органы и ткани, а также доступность использования современных молекулярных технологий, таких как ДНК — микрочипо-

вый анализ, задачей токсикологов явилась оценка исходных свойств низкодифференцированных СК и сравнение их чувствительности/резистентности к действию токсикантов с прогениторными и высокодифференцированными дочерними клетками.

Под влиянием факторов внутриклеточной сигнальной трансдукции СК подвержены различным изменениям: пролиферации, дифференцировке, апоптозу, старению или реакциям адаптации в период терминальной стадии дифференцировки. Известны многие механизмы внутриклеточной сигнализации, инициируемые изменениями pH, Ca²⁺, cAMP, а также влиянием церамидов, активных молекул кислорода и другие. При этом гормоны, факторы роста, цитокины, нейротрансмиттеры, белки внеклеточного матрикса и молекулы межклеточной адгезии выполняют роль факторов экстраклеточной сигнальной коммуникации. Гар — сигнальная система межклеточных контактов включает ионы и небольшие молекулы, которые формируют поперечные связи между клетками с помощью сетевидных образований — коннексин-структурированных белковых фрагментов — коннексинов. Так называемый сетевой эффект инициируется триггерными внутриклеточными сигналами, связанными со стадиями клеточного цикла [42, 43].

Известно, что низкодифференцированные СК не способны к взаимодействию друг с другом с помощью механизма межклеточной Гар-сигнализации [42]. Наряду с этим показано, что каждый тип СК имеет специфические механизмы взаимодействия с элементами экстраклеточного матрикса в пределах СК-клеточных ниш [13]. Существенным недостатком низкодифференцированных СК человека является отсутствие обнаружения экспрессии гена, кодирующего белок — коннексин, а также — отсутствие функционирования Гар-сигнальной системы в области межклеточных контактов [42]. Однако эта сигнальная система была обнаружена в высокодифференцированных СК человека [43]. В раковых клетках, возникших из СК, не удалось идентифицировать систему Гар-сигнализации и экспрессию гена коннексина в культуре *HeLa* клеток

[44], что может быть обусловлено действием коннексин-зависимого механизма экспрессии онкогенов [45]. Более широкое использование взрослых СК в токсикологических исследованиях может позволить существенно расширить арсенал биологических методов оценки безопасного применения фармакологических препаратов у человека.

В последнее время получила распространение молекулярно-генетическая селекция эмбриональных СК в токсикологических исследованиях *in vivo*, благодаря присущей им функциональной пластичности по сравнению со взрослыми СК. К тому же эмбриональные СК, в отличие от взрослых СК, могут быть подвержены генетическим манипуляциям с целью клеточной модификации экзогенной ДНК. При проведении кардио-, гепато- и генотоксикологических исследований осуществляют имплантацию производных эмбриональных СК в ткани и применяют процедуры идентификации этапов их дифференцировки. Оценка финальных этапов дифференцировки эмбриональных СК в процессе скрининга клеток позволяет получить функционально полноценные клеточные линии кардиомиоцитов [45- 47] и гепатоцитов [48, 49].

"Стандартные" популяции эмбриональных СК могут быть отображены методами геномного анализа с целью получения модельной системы для токсикологических исследований *in vitro* [24, 26, 27]. Особое внимание заслуживают работы по использованию эмбрионального СК-теста (EST-test) в эмбриотоксикологических исследованиях, который позволяет изучать особенности торможения или стимуляции фармакологическими препаратами процесса дифференцировки эмбриональных СК в кардиомиоциты [23, 26, 50]. Метод EST-тестирования оказался высокочувствительным для поиска предикторов клеточной кардиотоксичности и имеет определённые преимущества перед стандартными радиоиммунными исследованиями [28]. Он также позволяет оценить гетерогенность популяции прекурсоров СК, обусловленную одновременным влиянием индукторов их дифференцировки и факторов роста *in vitro*, а также экспрессию селективных

белковых маркеров, активаторов дифференцировки СК [9, 51, 52].

Молекулярно-генетическая селекция позволяет получить высокоочищенные линии дифференцированных клеток. Klug и соавт. [54] достигли 99,8% степени "очистки" функционально полноценных кардиомиоцитов в результате сравнения экспрессии неомидин-чувствительных генов с контрольными значениями HС²-миозина кардиомиоцитоподобных СК. Расширение возможностей изучения молекулярно-генетических и функциональных особенностей гепатоцитов в процессе дифференциров-

ки эмбриональных СК достигнуто с применением генно-инженерных технологий, при участии ядерного фактора гепатоцитов-3 (HNF-3) [53]. На финальных этапах дифференцировки эмбриональных СК функциональная полноценность кардиомиоцитов изучалась методами клеточной электрофизиологии и оценкой экспрессии генов, контролирующих сократимость клеток предсердий и желудочков сердца [9, 52].

Заключение. Будущее СК-технологий в токсикологических исследованиях фармакологических соединений представляется многооб-

ещающим. Дальнейшее экстенсивное развитие рутинных методов токсикологических исследований с целью повышения валидности результатов *in vitro* необходимо для оптимизации подходов к оценке кардио-, гепато- и генотоксических эффектов. СК-технологии можно использовать как *in vitro* (сравнительно низкзатратные исследования), так и *in vivo*. Ожидается применение СК-технологий с целью изучения внутриклеточных "агрессивных" реакций типоспецифических токсиантов кожных покровов, респираторной и мочеполовой систем [55].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Theise N.D., Krause D.S.* Toward a new paradigm of cell plasticity // *Leukemia*. — 2002. — V. 16. — P. 542 — 548.
2. *Romalho-Santos M., Yoon S., Matsuzaki Y. et al.* "Stemness" transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells // *Science*. — 2002. — V. 298. — P. 597 — 600.
3. *Sato N., Sanjuau I.M., Heke M. et al.* Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse // *Dev. Biol.* — 2003. — V. 260. — P. 404 — 413.
4. *Martin G.R.* Isolation of pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1981. — V. 78. — P. 7634 — 38.
5. *Nagy A., Gorza E., Diaz E.M.* Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse // *Development* — 1990. — V. 110. — P. 815 — 821.
6. *Niwa H., Miyazaki J., Smith A.G.* Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, or self-renewal of ES cells // *Nat. Genet.* — 2000. — V. 24. — P. 372 — 376.
7. *Chambers I., Colby D., Robertson M. et al.* Functional expression cloning of nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells // *Cell*. — 2003. — V. 113. — P. 643 — 655.
8. *Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S. et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // *Science* — 1998. — V. 282. — P. 1145 — 1147.
9. *Muller M., Fleischmann B.K., Selbert S. et al.* Selection of ventricular — like cardiomyocytes from ES cells *in vitro* // *FASEB J.* — 2000. — V. 14. — P. 2540 — 2548.
10. *Reubinoff B.E., Pern M.F., Fong C.T. et al.* Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. // *Nat. Biotechnol.* — 2000. — V. 18. — P. 399 — 404.
11. *Xu R.H., Chen X., Li D.S. et al.* BMP 4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. // *Nat. Biotechnol.* — 2002. — V. 20. — P. 1261 — 1264.
12. *Rambhalta L., Chiu C.-P., Kundu P. et al.* Generation of hepatocyte — like cells from human embryonic stem cells // *Cell Transplant.* — 2003. — V. 12. — P. 1 — 11.
13. *Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // *Science*. — 1999. — V. 284. — P. 143 — 147.
14. *Clarke D.L., Johansson C.B., Wilbertz J. et al.* Generalized potential of adult neural stem cells // *Science* — 2000. — V. 288. — P. 1660 — 1663.
15. *Корочкин Л.И.* Стволовые клетки // *Генетика*. — 2002. — № 6. — С. 787 — 793.
16. *Кухарчук А.А., Радченко В.В., Сирман В.М.* Теория стволовых пространств. // *Трансплантология*. — 2004. — Т. 5, № 1. — С. 16 — 33.
17. *Yang L., Li S., Hatch H., et al.* *In vitro* trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2002. — V. 99. — P. 8078 — 8083.
18. *Bird S.D., Doevendans P.A., van Rooijen M.A. et al.* The human adult cardiomyocyte phenotype // *Cardiovasc. Res.* — 2003. — V. 58. — P. 423 — 434.
19. *Jackson K.A., Mi T., Goodell M.A.* Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1999. — V. 96. — P. 14482 — 14486.
20. *Zhao Y., Glesne D., Huberman E.* A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2003. — V. 100. — P. 2426 — 2431.
21. *Reyes M., Lund T., Lenvik T. et al.* Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells // *Blood*. — 2001. — V. 98. — P. 2615 — 2625.
22. *Alvares-Dolado M., Pardal R., Garcia-Verdugo J.M. et al.* Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocyte and hepatocytes // *Nature*. — 2003. — V. 425. — P. 968 — 973.
23. *Scholz G., Genschow E., Pohe I. et al.* Prevalidation of the embryonic stem cell test (EST) — a new *in vitro* embryotoxicity test // *Toxicol. In Vitro*. — 1999. — V. 13. — P. 675 — 681.
24. *Rohwedel J., Guan K., Hegert C. et al.* Embryonic stem cells as an *in vitro* model for mutagenicity, cytotoxicity and embryotoxicity studies: present state and future prospects // *Toxicol. In Vitro* — 2001. — V. 15. — P. 741 — 753.
25. *Vanparrys P.* ECVAM and pharmaceuticals // *Altern. Lab. Anim.* — 2002. — V. 2. — P. 221 — 223.
26. *Genschow E., Scholz G., Brown N. et al.* Development of prediction models for three *in vitro* embryotoxicity test in an ECVAM validation study // *In Vitro Mol. Toxicol.* — 2000. — V. 13. — P. 51 — 56.
27. *Spielmann H., Genschow E., Scholz G. et al.* Preliminary results of the ECVAM validation study in three *in vitro* embryotoxicity test. // *ATLA*. — 2001. — V. 29. — P. 301 — 303.
28. *Lavon N., Bevenisty N.* Differentiation and genetic manipulation of human embryonic stem cells and the analysis of the cardiovascular system // *Trends Cardiovasc. Med.* — 2003. — V. 13. — P. 47 — 52.
29. *Makino S., Fukuda K., Miyoshi S. et al.* Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro* // *J. Clin. Invest.* — 1999. — V. 103. — P. 697 — 705.
30. *Shake J.G., Gruber P.J., Baumgarther W.A. et al.* Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects // *Ann. Thorac. Surg.* — 2002. — V. 73. — P. 1919 — 1925.
31. *Toma C., Pittenger M.F., Cahill K.S. et al.* Human mesenchymal stem cell differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart // *Circulation*. — 2002. — V. 105. — P. 93-98.
32. *Шумаков В.И., Казаков Э.Н., Онущенко Н.А. и соавт.* Первый опыт

- клинического применения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток мозга для восстановления сократительной функции миокарда. // Рос. кардиол. журн. — 2003. — № 5. — С. 42 — 50.
33. *Rancy J., Mueller L., Duan K. et al.* Expression and induction of CYP2C P450 enzymes in primary cultures of human hepatocytes // *Drug. Metab. Disp.* — 2002. — V. 302. — P. 475-482.
 34. *Kuehl P., Zang J., Lin Y. et al.* Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis for polymorphic CYP 3A5 expression // *Nat. Genet.* — 2001. — V. 4. — P. 383 — 391.
 35. *Lamba J., Lin Y., Thummel K. et al.* Common allelic variants of cytochrome P450 3A4 and their prevalence in different population // *Pharmacogenetics.* — 2002. — V. 12. — P. 1 — 12.
 36. *Scarpelli D.G., Rao M.S.* Differentiation of regenerating pancreatic cells into hepatocyte — like cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1981. — V. 78. — P. 2577 — 2581.
 37. *Schwartz R.E., Reyes M., Koodie L. et al.* Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte — like cells // *J. Clin. Invest.* — 2002. — V. 109. — P. 1291 — 1302.
 38. *Alison M.R., Poulson R., Jeffry R. et al.* Hepatocytes from nonhepatic adult stem cells // *Nature.* — 2000. — V. 406. — P. 257 — 258.
 39. *Miki T., Cai H., Lehmann T.L.* Production of hepatocytes from human amniotic stem cells // *Hepatology.* — 2002. — V. 36. — P. 171 — 172.
 40. *Trosko J.E.* The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis // *J. Biochem. Mol. Biol.* — 2003. — V. 36. — P. 43-48.
 41. *Trosko J.E.* Human stem cell as targets for the aging and diseases of aging processes // *Med. Hypotheses.* — 2003. — V. 60. — P. 439 — 447.
 42. *Trosko J.E., Chang C.C., Wilson M.R. et al.* Gap junctions and the regulation of cellular function of stem cells during development and differentiation // *Methods.* — 2000. — V. 20. — P. 245 — 264.
 43. *Lo C.W.* The role of Gap-junctional membrane channels in development // *J. Bioenerg. Biomembr.* — 1996. — V. 28. — P. 379 — 385.
 44. *King T.J., Fukushima L.H., Donlon T.A.* Correlation between growth control, neoplastic potential and endogenous connexin 43 expression in Hela cell lines: implications for tumor progression // *Carcinogenesis* — 2000. — V. 21. — P. 311 — 315.
 45. *Trosko J.E., Ruch R.J.* Cell-cell communication in carcinogenesis. // *Front. Biosci.* — 1998. — V. 3. — P. 208 — 236.
 46. *Kehat I., Kenyagin-Karsenti D., Snir M. et al.* Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. // *J. Clin. Invest.* — 2001. — V. 108. — P. 407 — 414.
 47. *Kehat I., Gepstein A., Spira A. et al.* High-resolution electrophysiological assessment of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes // *Circ. Res.* — 2002. — V. 91. — P. 659 — 661.
 48. *Mummery C., Ward D., Van den Brink C.E.* Cardiomyocyte differentiation of mouse and human embryonic stem cell. // *J. Anat.* — 2002. — V. 200. — P. 489-493.
 49. *Choi D., Oh H.J., Chang U.J. et al.* In vivo differentiation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes // *Cell Transplant.* — 2002. — V. 11. — P. 359 — 368.
 50. *Yamada T., Yoshikawa M., Kanda S. et al.* In vivo differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like identified by cellular uptake of indocyanine green // *Stem Cells.* — 2002. — V. 20. — P. 146 — 154.
 51. *Newall D.R., Beedless K.E.* The stem cell test: an in vitro assay for teratogenic potential. Results of a blind trial with 25 compounds. // *Toxicol. in Vitro.* — 1996. — V. 10. — P. 229 — 240.
 52. *Pfeifer A., Ikawa M., Duyan Y. et al.* Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2002. — V. 99. — P. 2140 — 2145.
 53. *Hidaka K., Lee J., Kim H.S. et al.* Chamber-specific differentiation of Nkx 2.5 — positive cardiac precursor cells from embryonic stem cells // *FASEB J.* — 2003. — V. 17. — P. 1311 — 1320.
 54. *Ishizaka S., Shiroy A., Kanda S. et al.* Development of hepatocytes from ES cells after transfection with the HNF-3 β -gene // *FASEB J.* — 2002. — V. 16. — P. 1444 — 1446.
 55. *Klug M.G., Sconpaa M.M., Koh G.Y. et al.* Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts // *J. Clin. Investig.* — 1996. — V. 98. — P. 216 — 224.
 56. *Gorba T., Allsepp T.E.* Pharmacological potential of embryonic stem cells. — 2003. — V. 47. — P. 269 — 278.

В.Н.Залеський, О.Б. Динник, Є.Л. Левицький
**МОЛЕКУЛЯРНА ТОКСИКОЛОГІЯ: СУЧАСНИЙ
 СТАН ТА ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ
 СТВОЛОВИХ КЛІТИН ДЛЯ ОЦІНКИ КЛІТИННИХ
 ПРЕДИКТОРІВ ТА ПОШУКУ БІОМАРКЕРІВ
 ПРОЦЕСІВ КАРДІО-, ГЕПАТО- ТА
 ГЕНОТОКСИЧНОСТІ**

Здійснений аналіз використання створених клітин для оцінки дії клітинних предикторів та пошуку біомаркерів процесів кардіо-, гепато- та генотоксичності фармакологічних засобів.

V.N. Zalessky, O.B. Dynnyk, E.L. Levitsky
**MOLECULAR TOXICOLOGY: MODERN SITUATION
 AND PERSPECTIVES OF THE USE OF STEM CELLS AS
 PREDICTORS AND BIOMARKERS OF THE CARDIO-,
 HEPATO- AND GENOTOXICITY PROCESSES**

The participation of stem cells in analysis predictors and molecular markers of the cardio-, hepato- and genotoxicity of the pharmacological drugs is described.