

УДК: 576:575.16

Особенности стволовых клеток в разные периоды онтогенеза Н.В.Колот

*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)
natakolot@mail.ru*

В процессе онтогенеза все органы и ткани сохраняют «предшественники» зародышевой ткани в виде микровкраплений стволовых клеток. Стволовые клетки на всех стадиях онтогенеза участвуют в поддержании клеточного гомеостаза, который основан на постоянном самообновлении клеток. Однако присутствие в организме стволовых клеток не защищает его от необратимой стадии онтогенеза – старения. Возникает вопрос, в какой степени и какие изменения претерпевают стволовые клетки в процессе старения, или возрастные изменения связаны с их соматическим микроокружением. В данном обзоре рассматриваются и анализируются данные, касающиеся изменения свойств стволовых клеток и их микроокружения в процессе онтогенеза, а также описывается геронтологический анализ исследований стволовых клеток.

Ключевые слова: *стволовые клетки, онтогенез, старение.*

Особливості стовбурових клітин в різні періоди онтогенезу Н.В.Колот

У процесі онтогенезу всі органи і тканини зберігають «попередники» зародкової тканини у вигляді микровкраплення стовбурових клітин. Стовбурові клітини на всіх стадіях онтогенезу беруть участь у підтриманні клітинного гомеостазу, який базується на постійному самооновленні клітин. Проте присутність в організмі стовбурових клітин не захищає його від необоротної стадії онтогенезу – старіння. Виникає питання, в якій мірі і які зміни зазнають стовбурові клітини в процесі старіння, або вікові зміни пов'язані з їх соматичним мікрооточенням. У даному огляді розглядаються і аналізуються дані, що стосуються зміни властивостей стовбурових клітин та їх мікрооточення в процесі онтогенезу, а також описується геронтологічний аналіз досліджень стовбурових клітин.

Ключові слова: *стовбурові клітини, онтогенез, старіння.*

Features of stem cells at different stages of ontogenesis N.V.Kolot

In the process of ontogenesis all organs and tissues of humans and mammals retain "precursors" of embryonic tissue as «minor inclusions» of stem cells. Stem cells are involved in maintaining cellular homeostasis at all stages of ontogenesis, which is based on constant self-renewal of cells. The presence of stem cells in the organism does not protect it from the irreversible stage of ontogenesis – aging. The question is what changes occur in the stem cells at aging and to what extent or age-related changes are due to their somatic environment. The data are discussed and analysed which show changes in the properties of stem cells and in their environment in ontogenesis, also the article describes analysis of gerontological research involving stem cells.

Key words: *stem cell, ontogeny, aging.*

Во всем мире проводятся научные исследования по изучению биологии стволовых клеток (СК): исследуются экспрессия генов развития, сигнальные пути и рецепторные межклеточные взаимодействия, управляющие клеточным делением, миграцией, дифференцировкой и трансдифференцировкой, процессы репрограммирования дифференцированных клеток. Но для изучения вышеперечисленных процессов необходимо знать, что происходит со СК в процессе онтогенеза организма. Поэтому в данном обзоре будет обсуждаться происхождение СК, их особенности и роль на разных стадиях онтогенеза.

В онтогенезе СК принимают участие в компенсаторной регенерации и самообновлении всех клеточных популяций, защищая тканеспецифические функции на протяжении всей жизни организма. Однако СК являются не автономной единицей развития, поскольку специализированное микроокружение, или стромальная ниша контролирует и может изменить их «судьбу» (Blazsek, Oberlin, 2003).

Особенности стволовых клеток в эмбриональный период.

Известно, что плюрипотентные эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) появляются на ранних стадиях онтогенеза во внутренней клеточной массе бластоциста, из которой в процессе развития многоклеточного организма формируются эмбриональные ткани (Лагарькова и др., 2006; Прыжкова, Лагарькова, 2004). Бластоциста представляет собой «стволовую нишу», в которой впервые четко разделены эмбриобласт (ЭСК) и поддерживающие клетки трофобласта, которые служат фидером для эмбриобласта и блокируют его неконтролируемую пролиферацию (Henderson et al., 2002). При этом геном ЭСК находится в «нулевой точке», откуда стартуют две главные программы эмбриогенеза: гаструляция и органогенез, контролирующиеся примерно 5000 генами (Галицкий, 2009; Voiani, Schöler, 2005). На ранней стадии гаструлы ЭСК имеют неограниченный пролиферативный потенциал и генерируют все типы мультипотентных СК эмбриона и взрослого организма, с уникальными и чрезвычайно сложными функциями (Репин, 2001). Поверхностными маркерами ЭСК являются: SSEA-3, GCTM-2, SSEA-3, SSEA-4 и TRA-1-60, TRA-1-81 (Henderson et al., 2002; Ng et al., 2011). Унипотентные тканеспецифические стволовые клетки (ТСК) возникают на поздних стадиях эмбрионального периода и сохраняются во взрослых тканях/органах как пул самообновляющихся клеток: ТСК эпидермиса, кишечника, костного мозга, печени, сердца и почек и других. Особенностью СК в онтогенезе является поддержание тканевого гомеостаза, которое обеспечивается за счет регуляции процессов самообновления и дифференцировки, как в эмбриональный период развития, так и в тканях взрослого организма. Одним из регулирующих механизмов поддержания самообновления СК является ассиметрическое клеточное деление, при котором вследствие чего образуются две дочерние клетки, одна из которых производит целую линию генетически идентичных клеток, а другая постепенно детерминируется и превращается в унипотентные СК – предшественники, способные к развитию только в один тип дифференцированных клеток (Репин, 2001; Pera, Trounson, 2004).

Долгое время не принималось во внимание то, что костный мозг содержит гетерогенную популяцию СК. Однако целым рядом экспериментов было показано, что в костном мозге, кроме гематоэтических стволовых клеток (ГСК), находится пул негематоэтических ТСК (Анохина, Буравкова, 2007; Asahara et al., 1999; Lee, Stoffel, 2003; Orlic et al., 2003; Ratajczak et al., 2004a). Некоторые исследователи (Ratajczak et al., 2004a) считают, что некоторые типы ТСК запасаются в костном мозге на ранних стадиях развития, где они находят благоприятное микроокружение для выживания. Более того, предполагают, что в течение раннего развития плюрипотентные/мультипотентные ЭСК могут заселять различные органы, включая костный мозг. Следовательно, костный мозг потенциально может содержать весь спектр гетерогенной популяции СК, начиная с ранних плюрипотентных СК до ТСК, при этом костный мозг может служить универсальным источником СК для регенерации/восстановления тканей в процессе онтогенеза организма.

У млекопитающих в течение второго триместра гестации основным органом кроветворения является фетальная печень. Костный мозг на этом периоде онтогенеза содержит СК, которые генерируют хондроциты, остеобласты и фибробласты. Эти клетки гипотетически являются эмбриональными мезенхимальными стволовыми клетками (МСК), которые являются предшественниками для клеточной линии соединительной ткани. Так, культивирование МСК костного мозга при использовании специализированных питательных сред приводит к дифференцировке их в остеобласты, хондроциты, клетки гладкой мускулатуры и адипоциты (Jiang et al., 2002). Не исключается вероятность того, что в костном мозге может находиться, кроме МСК, ТСК хондроцитов, остеобластов и фибробластов.

Быстрое развитие/экспансия гематоэтических тканей происходит в конце второго триместра гестации, когда фибробласты и остеобласты в зародышевой кости начинают секретировать хемокин-стромальный фактор-1 (SDF-1), который является хемоаттрактантом для ГСК, экспрессирующих специфический трансмембранный G-белок, связываемый рецептором CXCR4 и способствующий миграции ГСК из фетальной печени в костный мозг (Ganju et al., 1998; Horuk, 2001). Исследования на нокаутных мышцах показали, что SDF-1-CXCR4 играет ключевую роль в колонизации костномозговых ГСК и в установлении гематопоза в костном мозге взрослых организмов, так как у нокаутных эмбрионов мыши в костном мозге нарушается гематопоз. Это показывает, что SDF-1-CXCR4 является одним из ключевых регуляторов хоуминга/удержания ГСК в костном мозге, при этом SDF-1 является лигандом только для CXCR4, а CXCR4 связывает только SDF-1. Важным переносчиком CXCR4+ ГСК

из фетальной печени является микроокружение костного мозга, которое создает хемоаттрактантный SDF-1 градиент. На этом периоде онтогенеза костный мозг содержит развитые сосуды, состоящие из эндотелиальных СК, которые возникают из гемангиобласта, имеют общего предшественника с ГСК. Возможно, что гемангиобласты приходят первыми в костный мозг и играют ключевую роль в становлении костномозгового гемапоэза. Пока еще не ясно, сохраняются ли гемангиобласты в костном мозге в течение постнатальной жизни. В исследованиях (Ratajczak et al., 2004b) показано, что в постнатальный период другие ТСК (для мышц, нейронов, печени, сердца, поджелудочной железы и почек) с ГСК и эндотелиальными СК накапливаются постепенно в костномозговой ткани. Эти клетки, подобно ГСК, экспрессируют CXCR4, и градиент SDF-1 является для них хемоаттрактантом.

Одной из характеристик ЭСК является высокая скорость деления и поддержание недифференцированного фенотипа. Для клеточного цикла ЭСК характерна короткая продолжительность ранней фазы G₁, именно в этой фазе клетки чувствительны к митогенным стимулам. Циклины и циклин-зависимые киназы контролируют клеточный цикл путем фосфорилирования генов-мишеней (онкосупрессоров – p53, Rb2 и других) (Cedar, Minger, 2008). Существуют регуляторные пути, обеспечивающие непрерывное продвижение ЭСК по клеточному циклу. Установлено, что белок Rb находится в ЭСК преимущественно в гиперфосфорилированном состоянии и не способен взаимодействовать с E2F и подавлять его транскрипционную функцию. Комплексы циклин A-CDK2, циклин E-CDK2, фосфорилирующие Rb, стимулируют переход из фазы G₁ в фазу S клеточного цикла, активны в ходе всего клеточного цикла ЭСК (Stead et al., 2002). Транскрипционные факторы E2F в свою очередь активируют транскрипцию генов циклина E, циклина A и *e2f1*, необходимых для продвижения по клеточному циклу (Boiani, Schöler, 2005). Имеются данные, показывающие, что негативные регуляторы пролиферации, такие как ингибитор циклин-киназных комплексов p21Waf1, вовлеченные в ответ на стресс, находятся на низком уровне в ЭСК и не участвует в контроле их клеточного цикла. Интересно, что ЭСК не прекращают делиться при экспрессии ингибитора комплексов циклина D с CDK4 (Чуйкин и др., 2007), а частота спонтанных мутаций в ЭСК значительно меньше, чем в соматических клетках (Анисимов, 2003; Cervantes et al., 2002). Воздействия, приводящие к нарушению первичной структуры ДНК в ЭСК, вызывают их апоптоз, который способствует сохранению генетической стабильности данных клеток, предотвращая накопление ошибок в ДНК. На сегодня неизвестны агенты, способные блокировать деление СК, не вызывая одновременно апоптоз и/или запуск дифференцировки (Stead et al., 2002).

В последние годы активно изучается молекулярная основа регуляции плюрипотентности в эмбрионе. Идентифицирована большая группа генов, необходимых для развития плюрипотентных клеток. Эту группу составляют гены белков, контролирующих тотипотентность генома ЭСК (*Oct4*, *Otx1*, *Otx2*), белков-контролеров тотипотентности (*Sox1*, *Sox2*, *Sox3*, *Zic-1*, *Zic-2*, *Zic-3*, *Xash-3*, *Xbdx*), сигналов пролиферации (*Wnt-1*, *Wnt-2*), контролеров закладки органов и маркеров оценки эффективности дифференцировки (*FoxD3*, *taube nuss*) (Петренко и др., 2011). Ключевыми маркерами плюрипотентных клеток эмбриона являются транскрипционные факторы *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* (Avilion et al., 2003; Chambers, 2004). В отсутствие *Oct4* *in vivo* эпибласт и *in vitro* ЭСК дифференцируются в трофобласт. Превышение эндогенного уровня экспрессии *Oct4* в ЭСК приводит к дифференцировке в экстраэмбриональную эндодерму. В эмбриогенезе *Oct4* экспрессируется на начальной стадии во всех бластомерах и участвует в формировании внутренней клеточной массы бластоциста. В процессе онтогенеза происходит дифференцировка внутренней клеточной массы, сопровождающаяся снижением экспрессии фактора транскрипции *Oct4* (Pan et al., 2002). В процессе развития зародыша *Nanog* включается позже, чем *Oct4* и непосредственно регулирует экспрессию генов *Oct4* и *Sox2* (Chambers et al., 2003). Для поддержания ЭСК мыши в недифференцированном состоянии *in vitro* необходимы факторы LIF и BMP (Ying et al., 2003). Следует отметить, что каждый клеточный тип характеризуется определенным эпигенетическим статусом генома, который программирует экспрессию генов (Melcer et al., 2012). В процессе гаметогенеза, эмбрионального развития и тканеспецифической дифференцировки геном подвергается изменению паттерна метилирования ДНК и модификаций гистонов, что приводит к ослаблению или усилению «заархивированности» ДНК в хроматине (Gaspar-Maia et al., 2011; Thomson et al., 1998). Гистоны в ЭСК модифицированы так, чтобы поддерживать хроматин в расслабленном, «открытом» состоянии, что даёт возможность клетке выбирать программу для развития. Хроматин далее модифицируется путем добавления посттрансляционных модификаций в гистоны, таких как метил-, ацетил-, фосфорил- и АДФ-рибозидная группы (Melcer et al., 2012). Так, «открытая» конформация хроматина с высоким уровнем

эпигенетических меток (гистон H3K4me3 и ацетилирование гистонов H3 и H4) была обнаружена *in vivo* во внутренней клеточной массе мышей (Grass et al., 2003). Метилирование ДНК у многоклеточных эукариот осуществляется за счет метилтрансфераз DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b, ассоциировано с неактивным состоянием хроматина, ингибированием экспрессии генов и возрастает по мере дифференцировки клеток. Модификации гистонов могут служить как *cis*-действующие связывающие места для вспомогательных факторов, таких как гетерохроматиновый белок 1, который связывается с гистоном H3 за счёт триметилирования по остатку Lys9 (H3K9me3). Это взаимодействие контролируется гистоновыми метилтрансферазами: Suv39h1 и Suv39h2 и является необходимым для нормального развития эмбриона (Takahashi, Yamanaka, 2006). За метилирование H3K9 отвечает фермент метилтрансфераза G9a, которая соединяется с промотором *Oct4* и участвует в его подавлении после дифференцировки (Flores, Blasco, 2010). Активное участие в регуляции клеточной дифференцировки играют белки группы Polycomb (PcG). В результате их действия структура хроматина видоизменяется, что не позволяет транскрипционным факторам связываться с промоторными последовательностями ДНК. Модулируя структуру хроматина, белки PcG играют важную роль в сайленсинге гомеостатических генов и запускают эпигенетический механизм выключения экспрессии на уровне транскрипции (Musina et al., 2004). Геномный анализ некоторых PcG белков в ЭСК человека и мыши выявил, их локальное скопление на «молчащих» онтогенетически регуляторных генах. Более того, гены мишени для PcG белков обнаруживают тенденцию одновременно активироваться транскрипционными факторами-регуляторами плюрипотентного состояния *Oct4*, *Sox2* и *Nanog*. В отсутствие PcG белков, таких как EED, SUZ12, EZH2, клетки находятся в недифференцированном состоянии (Prezioso, Orlando, 2011). Известно, что в ЭСК отсутствует ламин А, что обеспечивает динамическое положение хроматина в ядре клетки и позволяет дифференцироваться клетке в любой тип (Morey, Helin, 2010). Эпигенетические механизмы регулируют экспрессию транскрипционных факторов семейства GATA, участвующих в дифференцировке клеток в различные типы. Так, например, транскрипционный фактор GATA-2 участвует в дифференцировке клеток в гематопоэтические и эндотелиальные клетки. Однако для созревания эритроидных клеток необходимо инактивировать экспрессию GATA-2 путем связывания GATA-1 с энхансером гена GATA-2, что приводит к деацетилированию гистонов в области энхансера и промоторов гена GATA-2 (Gaspar-Maia et al., 2011). Кроме этого, в ЭСК обнаружено около 6 микро-РНК, регулирующих плюрипотентность клеток за счет изменения экспрессии факторов транскрипции (*Oct4*, *Sox2*, *Nanog*) (Cedar, Minger, 2008; Gaspar-Maia et al., 2011).

Особенности стволовых клеток в постнатальный период онтогенеза.

Имеются данные о наличии в тканях млекопитающих и человека взрослых или региональных СК, которые не исчезают в процессе онтогенеза. Региональные СК обладают регенераторным потенциалом ЭСК, сохраняются небольшой популяцией в большинстве тканей взрослого организма и участвуют в клеточном обновлении тканей/органов (Анисимов, 2003; Петренко и др., 2011; Чернилевский, 2008). Репаративная регенерация в течение онтогенеза возможна за счет малодифференцированных клеток, резервных клеток (клетки, которые в ходе эмбриогенеза являются предшественниками клеток, формирующих ткани и органы и сохраняются в виде резерва в тканях взрослого организма) и СК (Стадников, Шевлюк, 2006).

Доказательством присутствия стволовых клеток во взрослом организме явились исследования А.Я.Фриденштейна, который обнаружил СК в мезенхиме (строме) «взрослого» костного мозга (Анохина, Буравкова, 2007; Корочкин, 2003; Musina et al., 2004). Во взрослом костном мозге присутствует гетерогенная популяция стволовых клеток костного мозга (Анохина, Буравкова, 2007; Ratajczak et al., 2004a). ГСК являются тканеспецифическими для гемато/лимфопоэза и представляют наиболее многочисленную популяцию СК в костном мозге. Эти клетки, кроме CXCR4, экспрессируют CD34, CD45, CD133, CD117 и линии отрицательных маркеров (lin-) (Gallacher et al., 2000). Костный мозг также содержит популяцию эндотелиальных стволовых/прогениторных клеток, которые могут выходить из костного мозга, циркулировать в периферической крови, способствовать регенерации поврежденных клеток сосудов, сердца, поджелудочной железы, лёгких (Asahara et al., 1999). Эндотелиальные ТСК экспрессируют CD34, VEGFR2 (KDR), TIE2 и отрицательный маркер CD45 (Boyer et al., 2000). ГСК и эндотелиальные ТСК в эмбриогенезе имеют общего предшественника – гемангиобласт. Известно, что в костном мозге, кроме вышеперечисленных клеток, имеются мезенхимальные стволовые клетки (МСК), которые экспрессируют Stro-1, CD-90 (Thy-1) и CD106 антигены и могут *in vitro* дифференцироваться в адипоциты, хондроциты, остеобласты (Hipp, Atala,

2010). Имеются также экспериментальные данные, показывающие способность МСК дифференцироваться в нервные клетки, кардиомиоциты и другие клетки (Jiang et al., 2002; Orlic et al., 2003; Ratajczak et al., 2004b). Мультипотентные взрослые прогениторные клетки первоначально были описаны как мезодермальные прогениторные клетки, но исследования показали, что они могут «переходить» границы зародышевых слоев и дифференцироваться не только в кость, хрящ или клетки гладкой мускулатуры (мезодерму), но также в гепатоциты, клетки поджелудочной железы (эндодерму) или нервные клетки (эктодерму) (Jiang et al., 2002; Keene et al., 2003; Schwartz et al., 2002). Так, плюрипотентные СК, выделенные из мышечной ткани, способны дифференцироваться в гематопоэтические клетки, миоциты, нервные клетки и адипоциты в культуральной среде, стимулирующей гематопоэтическую, миогенную, нейрогенную и адипогенную дифференцировку. Некоторые ученые описывают присутствие плюрипотентных СК в мозге, крови и кишечном эпителии (Howell et al., 2003; Hipp, Atala, 2010). CXCR4+ ТСК, обнаруженные в костном мозге, экспрессируют мРНК для маркеров ранних тканеспецифических стволовых/прогениторных клеток скелетной мускулатуры (Myf-5, Myo-D), кардиомиоцитов (Nkx2.5, GATA-4, Mef2C), нервных клеток (GFAP, nestin), эндотелиальных (VE-кадерин, Виллебранда), клеток поджелудочной железы (Nkx6.1, Pdx1, Ptf1) и печени (CK19, фетопротеин). Эти клетки имеют фенотип у людей CXCR4+ CD34+ CD133+ CD45- и CXCR4+ Sca-1+ c-kit+ CD45- у мышей (Jiang et al., 2002; Keene et al., 2003; Orlic et al., 2003; Schwartz et al., 2002).

Преобладающим типом среди культивируемых мультипотентных взрослых прогениторных клеток и МСК костного мозга являются фибробластные клетки, которые секретируют SDF-1. Возможно, CXCR4+ ТСК имеют большую адгезирующую способность к пластику и находятся в тесном контакте с фибробластами, которые секретируют SDF-1 или тканеспецифические (остеогенные, кардиомиогенные, нейрональные или гепатоцитарные клетки) СК встроены между стромальными фибробластами. В исследованиях (Pountos, Giannoudis, 2005) показано, что в популяции мезенхимальных клеток только около 30% являются плюрипотентными, а основная масса клеток может образовывать только один или два клеточных типа.

Известно, что ТСК способны отвечать не только на градиент SDF-1, но и на градиенты HGF и LIF, которые создаются поврежденными тканями и, возможно, ранние тканеспецифические CXCR4+ c-Met+ LIF-R+ клетки переходят из костного мозга в периферическую кровь, а затем в поврежденный орган, где участвуют в восстановлении/регенерации ткани (Ganju et al., 1998). Однако не исключено, что, кроме SDF-1, HGF и LIF, и другие факторы принимают участие в переходе этих клеток к поврежденным тканям. Так, VEGF является хемоаттрактантом не только для ЭСК, но также и для нейрональных ТСК (Zhang et al., 2003).

Анатомо-физиологическое и биохимическое микроокружение, или ниши СК представляет собой взаимоотношения клеточной среды, которые обеспечивают существование и течение биологических процессов, необходимых для существования и функции СК. Микроокружение сохраняет пул СК от истощения, регулируя переход клетки из детерминированного состояния в дифференцировку, так как СК и микроокружение составляют динамическую систему, определяющую регенерационные способности тканей организма (Камалов, Охоботов, 2012). В костном мозге для направленной дифференцировки мезенхимальных и гематопоэтических клеток используется одно и то же микроокружение, а направление дифференцировки определяют внеклеточные и межклеточные сигналы, которые различны для разных типов клеток (Терских, 2007; Baksh et al., 2004). Стромальные клетки костного мозга в свою очередь обеспечивают подходящее микроокружение для самообновления, пролиферации и дифференцировки ГСК (Камалов, Охоботов, 2012).

В онтогенезе СК возникают в определенный временной промежуток и часто формируются в одних участках организма, а выполняют свою функцию – в других, в связи с этим наблюдается миграция СК в новое микроокружение. Так, первые ГСК мыши появляются вне эмбриона в желточном мешке, на следующих этапах развития организма обнаруживаются в аорта-гонадамезонефросе, а в позднем эмбриональном периоде органом кроветворения становится печень, и у взрослого организма кроветворение происходит в трубчатых костях и селезенке (Корочкин, 2003). В основном в тканях взрослого организма СК пролиферируют сравнительно медленно, но имеется небольшое количество СК, находящихся в состоянии глубокого покоя (Чернилевский, 2008). Процесс самообновления СК регулируют гены, транскрипционные факторы, микроРНК, разнообразные цитокины, морфогенетические лиганды и ассоциированные с ними сигнальные компоненты. СК взрослого

організму можуть вступити в «асиметричний митоз», але можуть ділитися симетрично, потрадаючи в різне мікросередовище, клітини можуть диференціюватися по різних шляхах (Hipp, Atala, 2010).

Стволові клітини в період старіння організму.

Незважаючи на наявність в організмі ТСК, як в кістковому мозку, так і периферическої крові, і їх участь в регенерації тканин, організм підвргнутий необратимому процесу – старінню, який затрагує всі тканини і системи. По даним авторів (Фролькіс, 1990; Чернилевський, 2002; Beausejour, Campisi, 2006) старіння представляє собою перманентні скорочення розмірів ствольових просторів організму, то єсть пула регіональних або тканеспецифічних «взрослих» ствольових клітин. Дослідження (Ratajczak et al., 2004a) показали, що велике кількість ТСК присутствують в кістковому мозку молодих мишей (1–2 місяців, що відповідає 10 рокам у людини) і зменшується у старих тварин. Зменшення пули СК в кістковому мозку призводить до старіння всього організму, так як процес регенерації стає менш ефективним. Пул «взрослих» СК в організмі може скорочуватися під впливом генетических, факторів зовнішнього середовища, харчування, образу життя. Крім того, відомо, що кількість клітин в ствольових просторах є генетически запрограммованим, що визначає обмеженість проліферативного потенціалу ствольового простору і швидкість старіння окремих органів і систем організму. Після вичерпання резервів ствольових просторів інтенсивність і швидкість старіння соматических диференційованих клітин багатоклітинного організму значно прискорюється. Необхідно відзначити, що преждевременне старіння є наслідком малих розмірів всіх ствольових просторів організму (Carlson, Conboy, 2007; Musina et al., 2004). Однак в роботах (Стадніков, Шевлюк, 2006; Prezioso, Orlando, 2011) описується, що при визначених умовах *in vitro* МСК проліферують без помітного старіння, а *in vivo* мають обмежений проліферативний потенціал. Можливо, в процесі онтогенезу на стадії старіння МСК переходять в G_0 фазу або починають повільно ділитися. Даний питання протиріччю і не може вважатися вирішеним.

Ряд дослідників зв'язують процес старіння з укороченням теломер в хромосомному апараті клітин (Зверева і др., 2010; Gan et al., 2008). Однак встановлено, що співвідношення довжини теломер і швидкості їх укорочення не визначає проліферативний потенціал клітинних популяцій і не обмежує тривалість життя багатоклітинних організмів, а гетерогенність теломер може бути наслідком стохастического характеру комітировання клітин до диференціювання і/або втрати здатності до проліферації. Відомо, що теломераза експресується тільки в СК, статевих клітинах і більшості опухольових клітинах, а соматическі клітини в час диференціювання втрачають теломеразну активність, що призводить до кінцевої недореплікації хромосом і, як наслідок, до проліферативного старіння клітин (Анісимов, 2003). Негативний вплив на довжину теломер також надають теломерозв'язуючі білки, метилювання ДНК і гістонов, які посилюють зв'язок теломер з ядерною ламиною (Галицький, 2009). Таким чином, старіння зв'язано не з зменшенням довжини теломер в онтогенезі, а з зменшенням активності теломераз в час диференціювання, і даний процес можна розглядати як проявлення зменшення суммарної транскрипційної і трансляційної активності генетического апарату в онтогенезі (Анісимов, 2003). МСК старіючого організму мають відмінні від клітин молодого організму паттерни генної експресії і відрізняються по морфології в культурі. Крім того, культуральна середовище МСК, виділеної з старого організму, містить маркери сенеценції (β -галактозидазу і інші), особливо при тривалій культивуванні. *In vitro* клітини, що знаходяться в термінальній фазі старіння, часто експресують цитокіни і ферменти, що руйнують не тільки клітини, але і структури внеклітинного матриксу. Висловлюються припущення, що і *in vivo* старіючі клітини, при достаточній кількості, можуть викликати зв'язані з віком порушення в структурі тканини або бути однією з причин старіння (Carlson, Conboy, 2007; Musina et al., 2004). Крім цього, необхідно враховувати, що на кожному етапі онтогенезу організму змінюється метаболізм в клітинах, що призводить до зміні «судьби» клітин і диктує стан, в якому їм необхідно знаходитися (розмножуватися, диференціюватися або залишатися в стані спокою). Останні дослідження показали, що при зрізанні СК дорослого організму і при перепрограмуванні соматических клітин в плюрипотентні відбувається зміщення в балансі між гліколізом, митохондриальним окислювальним фосфорилуванням і окислювальним стресом (Shyh-Chang et al., 2013).

Основною функцією СК є здатність зберігати цілісність ДНК в усьому організмі в процесі онтогенезу. При мутаціях включаються механізми запобігання помилкам і потужні

механизмы онкосупрессии, такие как сенесценция и апоптоз, устраняющие поврежденные СК, ограничивая репликативные возможности. Но, неустранимые генетические нарушения в СК могут передаваться в дифференцированные дочерние клетки и накапливаться с возрастом в организме, что приводит к старению. Так, ежедневное обновление клеток крови достигается за счет интенсивного деления и последующей ступенчатой дифференцировки долгосрочных ГСК в короткосрочные ГСК и более коммитированные гемапоэтические прогениторные СК. Пул долгосрочных ГСК защищает их геномную целостность за счет снижения репликации ДНК и снижает вероятность повреждения ДНК. Следует отметить, что процесс старения может быть сходным для всех соматических клеток, но механизмы старения между популяциями СК разных тканей отличаются (Orkin Zon, 2008).

Имеется много доказательств того, что с возрастом способность СК поддерживать тканевой гомеостаз снижается, что может приводить к возрастным изменениям фенотипа и многим заболеваниям (Beausejour, Campisi, 2006). Важно отметить, что животное-реципиент, после введения ГСК, живет дольше, чем животное-донор, хотя у старого животного-реципиента не происходит полного восстановления гемапоэтической системы до показателей молодых животных (Gordon, Blakett, 1998). Кроме этого, иммунофенотипические характеристики гемапоэтических стволовых и прогениторных клеток отличаются у молодых и старых животных. Так, иммунофенотипически долгосрочные ГСК приблизительно в три раза меньше у старых животных, чем у молодых (Yilmaz et al., 2006). Также с возрастом отмечаются изменения дифференцировки СК и снижение их способности к хоумингу (Liang et al., 2005). Хотя стволовые и прогениторные клетки гарантируют восстановление/регенерацию тканей, но при воздействии онкогенных мутаций, повреждении ДНК, нарушениях функционирования теломер, действии свободных радикалов, стрессов и других неблагоприятных факторов могут возникать гиперпролиферативные болезни, такие как опухолеобразование, которые связаны со снижением онкосупрессорных механизмов. Так, увеличение с возрастом экспрессии онкосупрессоров (pRb, p16^{INK4a}, p19^{ARF}) включает апоптоз и/или сенесценцию опухолевых клеток, ингибируя неопластический рост и развитие опухоли (Zhao, Xu, 2010). Но в то же время увеличение экспрессии онкосупрессоров может иметь отрицательный эффект на функциональность СК, снижая их способность к самообновлению или дифференцировке, что приводит к старению организма и проявлению фенотипа старения (Beausejour, Campisi, 2006). Известно также, что на поздних стадиях онтогенеза возникает снижение способности в стволовых и дифференцированных клетках подавлять транскрипционную активность мобильных элементов генома (ретротранспозонов), что приводит к ускоренной эрозии теломер, повреждению ДНК, изменению хроматина, нарушает регенеративную способность клеток и запускает процесс клеточного старения (Whitelaw, Martin, 2001). С другой стороны, рассматривается теория о том, что стволовые клетки не имеют внутренней причины старения и выполняют свою функцию по самообновлению организма до конца жизни, противодействуя старению. Но влияние возрастного изменения микроокружения стволовых клеток в стареющем организме изменяет их свойства и функции. На тканевом уровне старение может быть обусловлено распадом межклеточных взаимодействий, так, апоптоз одних клеток приводит к гибели других клеток и нарастающему снижению синтеза цитокинов, при помощи которых данные клетки поддерживали друг друга. На клеточном уровне при старении наблюдаются нарушение архитектоники клеточных ядер фибробластов, изменение толщины и белкового состава ядерной ламины, эрозия теломер, нарастание концентрации проапоптотных маркеров, деметилирование ДНК и увеличение количества ее повреждений (Галицкий, 2009). Некоторые исследователи считают, что механизм упаковки клеточных структур во время онтогенеза влияет на старение клеток и организма в целом. В многоклеточных организмах клеточные контакты формируют клеточные упаковки, обеспечивающие их циклическое функционирование, пролиферацию клеток, редукцию, регенерацию тканей и обменные процессы. Межклеточное вещество, отложения и части клеток формируют зоны, разделяющие элементы упаковок, образуя постоянные структуры, между которыми существует равновесие, а критические состояния развития организма характеризуются перестройкой, разрушением и созданием новых упаковок. Разрушение небольшого участка упаковки стимулирует пролиферацию клеток и регенерацию ткани, а нарушение большого участка уничтожает упаковку. Наличие у млекопитающих разделителей не позволяет осуществить регенерацию тканей и является предельным вариантом гистерезисного накопления, приводящего к гибели организма. В развитии организма возникновение таких разделителей можно представить как ряд критических состояний (остановка роста) (Чернилевский, 2008).

Таким образом, из данного обзора видно, что, несмотря на уникальные свойства СК организм многоклеточных организмов в процессе онтогенеза претерпевает старение. При этом на сегодня не существует единой теории старения, а предложенные теории старения не позволяют создать полную картину данного процесса, что требует подробного исследования молекулярно-генетических особенностей стволовых клеток в разные периоды онтогенеза и проведения поиска способов продления жизни организмов.

Список литературы

- Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. – СПб: Наука, 2003. – 468с. /Anisimov V.N. Molekulyarnyye i fiziologicheskiye mekhanizmy stareniya. – SPb: Nauka, 2003. – 468s./
- Анохина Е.Б., Буравкова Л.Б. Гетерогенность стромальных клеток-предшественников, выделенных из костного мозга крыс // Цитология. – 2007. – Т.49, №1. – С. 40–47. /Anokhina Ye.B., Buravkova L.B. Geterogennost' stromal'nykh kletok-predshestvennikov, vydelennykh iz kostnogo mozga krysv // Tsitologiya. – 2007. – T.49, №1. – S. 40–47./
- Галицкий В.А. Эпигенетическая природа старения // Цитология. – 2009. – Т.51, №5. – С. 388–397. /Galitskiy V.A. Epigeneticheskaya priroda stareniya // Tsitologiya. – 2009. – T.51, №5. – S. 388–397./
- Зверева М.Э., Щербаклова Д.М., Донцова О.А. Теломераза: структура, функции и пути регуляции активности // Успехи биологической химии. – 2010. – Т.50. – С. 155–202. /Zvereva M.E., Shcherbakova D.M., Dontsova O.A. Telomeraza: struktura, funktsii i puti regulyatsii aktivnosti // Uspekhi biologicheskoy khimii. – 2010. – T.50. – S. 155–202./
- Камалов А.А., Охоботов Д.А. Стволовые клетки и их использование в современной клинической практике // Урология. – 2012. – №5. – С. 105–114. /Kamalov A.A., Okhobotov D.A. Stvolovyye kletki i ikh ispol'zovaniye v sovremennoy klinicheskoy praktike // Urologiya. – 2012. – №5. – S. 105–114./
- Корочкин Л.И. Стволовые клетки // Онтогенез. – 2003. – Т.34, №3. – С. 164–166. /Korochkin L.I. Stvolovyye kletki // Ontogenez. – 2003. – T.34, №3. – S. 164–166./
- Лагарькова М.А., Лякишева А.В., Филоненко Е.С. и др. Характеристика мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, выделенных методом иммуномагнитной селекции // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – №141. – С. 112–116. /Lagar'kova M.A., Lyakishева A.V., Filonenko Ye.S. i dr. Kharakteristika mezenkhimal'nykh stvolovykh kletok kostnogo mozga, vydelennykh metodom immunomagnitnoy selektsii // Byul. eksperimental'noy biologii i meditsiny. – 2006. – №141. – S. 112–116./
- Петренко А.Ю., Хунов Ю.А., Иванов Э.Н. Стволовые клетки. Свойства и перспективы клинического применения. – Луганск: «Пресс-Экспресс», 2011. – 368с. /Petrenko A.Yu., Khunov Yu.A., Ivanov Ye.N. Stvolovyye kletki. Svoystva i perspektivy klinicheskogo primeneniya. – Lugansk: «Press-Ekspress», 2011. – 368s./
- Прыжкова М.В., Лагарькова М.А. Стволовые клетки: современные тенденции исследований // Онтогенез. – 2004. – Т.35, №6. – С. 473–475. /Pryzhkova M.V., Lagar'kova M.A. Stvolovyye kletki: sovremennyye tendentsii issledovaniy // Ontogenez. – 2004. – T.35, №6. – S. 473–475./
- Репин В.С. Эмбриональная стволовая клетка // Успехи физиол. наук. – 2001. – Т.32, №1. – С. 3–18. /Repin V.S. Embrional'naya stvolovaya kletka // Uspekhi fiziol. nauk. – 2001. – T.32, №1. – S. 3–18./
- Стадников А.А., Шевлюк Н.Н. Стволовые клетки и репаративная регенерация в постнатальном онтогенезе млекопитающих // Морфология. – 2006. – №6. – С. 84–88. /Stadnikov A.A., Shevlyuk N.N. Stvolovyye kletki i reparativnaya regeneratsiya v postnatal'nom ontogeneze mlekopitayushchikh // Morfologiya. – 2006. – №6. – S. 84–88./
- Терских В.В. Ниши стволовых клеток // Изв. РАН. Сер. Биологическая. – 2007. – №3. – С. 261–272. /Terskiy V.V. Nishi stvolovykh kletok // Izv. RAN. Ser. Biologicheskaya. – 2007. – №3. – S. 261–272./
- Фролькис В.В. Генорегуляторные механизмы старения – основа развития возрастной патологии // Физиол. журн. – 1990. – №5. – С. 3–11. /Frol'kis V.V. Genoregulyatornyye mehhanizmy stareniya – osnova razvitiya vozrastnoy patologii // Fiziol. zhurn. – 1990. – №5. – S. 3–11./
- Чернилевский В.Е. Роль стволовых клеток в самообновлении организмов и возможности продления жизни // Доклады МОИП №41. Секция геронтологии. – М., 2008. – С. 82–95. /Chernilevskiy V.Ye. Rol' stvolovykh kletok v samoobnovlenii organizmov i vozmozhnosti prodleniya zhizni // Doklady MOIP №41. Sektsiya gerontologii. – M., 2008. – S. 82–95./
- Чернилевский В.Е. Роль стволовых клеток и упаковок клеточных структур в самообновлении и старении организмов // Докл. МОИП. Общая биол. – 2002. – С. 35–43. /Chernilevskiy V.Ye. Rol' stvolovykh kletok i upakovok kletochnykh struktur v samoobnovlenii i starenii organizmov // Dokl. MOIP. Obshchaya biol. – 2002. – S. 35–43./
- Чуйкин И.А., Лянгузова М.С., Пospelov В.А. Сигнальные пути, определяющие пролиферативную активность эмбриональных стволовых клеток мыши // Цитология. – 2007. – Т.49, №5. – С. 370–384. /Chuykin I.A., Lyanguzova M.S., Pospelov V.A. Signal'nyye puti, opredelyayushchiye proliferativnyuyu aktivnost' embrional'nykh stvolovykh kletok myshi // Tsitologiya. – 2007. – T.49, №5. – S. 370–384./
- Asahara T., Masuda H., Takahashi T. et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization // Circ. Res. – 1999. – Vol.85. – P. 221–228.

- Avilion A.A., Nicolis S.K., Pevny L.H. et al. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function // *Genes Dev.* – 2003. – Vol.17. – P. 126–140.
- Baksh D., Song L., Tuan R.S. Adult mesenchymal stem cells characterization, differentiation and application in cell and gene therapy // *J. Cell Mol.* 2004. – Vol.8, №3. – P. 301–316.
- Beausejour C.M., Campisi J. Ageing: balancing regeneration and cancer // *Nature.* – 2006. – Vol.443. – P. 404–405.
- Blazsek I., Oberlin E. Organotypic specification of stem-cell-nests during ontogenesis // *Exp. Hematology.* – 2003. – Vol.31, №7. – P. 76–80.
- Boiani M., Schöler H.R. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2005. – Vol.6. – P. 872–884.
- Boyer M., Townsend L., Vogel L.M. et al. Isolation of endothelial cells and their progenitor cells from human peripheral blood // *J. Vasc. Surg.* – 2000. – Vol.31. – P. 181–189.
- Carlson M.E., Conboy I.M. Loss of stem cell regenerative capacity within aged niches // *Aging Cell.* – 2007. – Vol.6. – P. 371–382.
- Cedar S.H., Minger S.L. Human embryonic stem cells: A model for human aging in vitro // *Experimental Gerontology.* – 2008. – Vol.43. – P. 1005–1008.
- Cervantes R.B., Stringer J.R., Shao C. et al. Embryonic stem cells and somatic cells differ in mutation frequency and type // *PNAS.* – 2002. – Vol.99. – P. 3586–3590.
- Chambers I. The molecular basis of pluripotency in mouse embryonic stem cells // *Cloning Stem Cells.* – 2004. – Vol.6, №4. – P. 386–391.
- Chambers I., Colby D., Robertson M. et al. Functional expression cloning of *Nanog*, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells // *Cell.* – 2003. – Vol.113. – P. 643–655.
- Flores I., Blasco M.A. The role of telomeres and telomerase in stem cell aging // *FEBS Letters.* – 2010. – Vol.584. – P. 3826–3830.
- Gallacher L., Murdoch B., Wu D.M. et al. Isolation and characterization of human CD34⁻ Lin⁻ and CD34⁺ Lin⁻ hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7 // *Blood.* – 2000. – Vol.95. – P. 2813–2820.
- Gan B., Sahin E., Jiang S. et al. mTORC1-dependent and -independent regulation of stem cell renewal, differentiation and mobilization // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2008. – Vol.105, №49. – P. 19384–19389.
- Ganju R.K., Brubaker S.A., Meyer J. et al. The α -chemokine stromal cell-derived factor-1 α binds to the transmembrane G-proteincoupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol.273. – P. 23169–23175.
- Gaspar-Maia A., Alajem A., Meshorer E. et al. Open chromatin in pluripotency and reprogramming // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2011. – Vol.12. – P. 36–47.
- Gordon M.Y., Blackett N.M. Reconstruction of the hematopoietic system after stem cell transplantation // *Cell Transplant.* – 1998. – Vol.7. – P. 339–344.
- Grass J.A., Boyer M.E., Pal S. et al. GATA-1-dependent transcriptional repression of GATA-2 via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodeling // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – Vol.100. – P. 8811–8816.
- Henderson J.K., Draper J.S., Bailie H.S. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage specific embryonic antigens // *Stem Cells.* – 2002. – Vol.20, Issue 4. – P. 329–337.
- Hipp J., Atala A. Sources of stem cells for regenerative medicine // *Sci. China Life.* – 2010. – Vol.53, №1. – P. 154–156.
- Horuk R. Chemokine receptors // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2001. – Vol.12. – P. 313–335.
- Howell J.C., Lee W.H., Morrison P. et al. Pluripotent stem cells identified in multiple murine tissues // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2003. – Vol.996. – P. 158–173.
- Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow // *Nature.* – 2002. – Vol.418. – P. 41–49.
- Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Jiang Y. et al. Neural differentiation and incorporation of bone marrow-derived multipotent adult progenitor cells after single cell transplantation into blastocyst stage mouse embryos // *Cell Transplant.* – 2003. – Vol.12. – P. 201–213.
- Lee V.M., Stoffel M. Bone marrow: an extra-pancreatic hideout for the elusive pancreatic stem cells? // *J. Clin. Invest.* – 2003. – Vol.111. – P. 799–801.

- Liang Y., Van Zant G., Szilvassy S.J. Effects of aging on the homing and engraftment of murine hematopoietic stem and progenitor cells // *Blood*. – 2005. – Vol.106. – P. 1479–1487.
- Melcer S., Hezroni H., Rand E. et al. Histone modifications and lamin A regulate chromatin protein dynamics in early embryonic stem cell differentiation // *Nat. Com.* – 2012. – Vol.19. – P. 1–12.
- Morey L., Helin K. Polycomb group protein-mediated repression of transcription // *Trends. Biochem. Sci.* – 2010. – Vol.35. – P. 323–332.
- Musina R.A., Egorov E.E., Beliavskii A.V. Stem cells: properties and perspectives of therapeutic use // *Mol. Biol.* – 2004. – Vol.38, №4. – P. 563–577.
- Ng H.H., Surani M.A. The transcriptional and signalling networks of pluripotency // *Nat. Cell Biol.* – 2011. – Vol.13, №5. – P. 490–496.
- Orkin S.H., Zon L.I. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology // *Cell*. – 2008. – Vol.132. – P. 631–644.
- Orlic D., Kajstura J., Chimenti S. et al. Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium // *Pediatr. Transplant.* – 2003. – Vol.7. – P. 86–88.
- Pan G.J., Chang Z.Y., Scholer H.R. et al. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4 // *Cell Res.* – 2002. – Vol.12, Issue 5–6. – P. 321–329.
- Pera M.F., Trounson A.O. Human embryonic stem cells: prospects for development // *Development*. – 2004. – Vol.131, №22. – P. 5515–5525.
- Pountos I., Giannoudis P.V. Biology of mesenchymal stem cells // *J. Care Injured*. – 2005. – Vol.36S. – P. S8–S12.
- Prezioso C., Orlando V. Polycomb proteins in mammalian cell differentiation and plasticity // *FEBS Letters*. – 2011. – Vol.585. – P. 2067–2077.
- Ratajczak M.Z., Kucia M., Majka M. et al. Heterogeneous populations of bone marrow stem cells – are we spotting on the same cells from the different angles? // *Folia Histochemica et Cytobiologica*. – 2004a. – Vol.42, №3. – P. 139–146.
- Ratajczak M.Z., Kucia M., Reza R. et al. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow // *Leukemia*. – 2004b. – Vol.18. – P. 29–40.
- 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. – Vol.109. – P. 1291–1302.
- Shyh-Chang N., Daley G.Q., Cantley L.C. Stem cell metabolism in tissue development and aging // *Development*. – 2013. – Vol.15, №140. – P. 2535–2547.
- Stead E., White J., Faast R. et al. Pluripotent cell division cycles are driven by ectopic Cdk2, cyclin A/E and E2F activities // *Oncogene*. – 2002. – Vol.21. – P. 8320–8333.
- Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell*. – 2006. – Vol.126. – P. 663–676.
- Thomson J.A., Itskovitzeldor J., Shapiro S.S. et al. Embryonic stem cells derived from human blastocysts // *Science*. – 1998. – Vol.282. – P. 1145–1147.
- Whitelaw E., Martin D.I. Retrotransposons as epigenetic mediators of phenotypic variation in mammals // *Nat. Genet.* – 2001. – Vol.27, №4. – P. 361–365.
- Yilmaz O.H., Kiel M.J., Morrison S.J. SLAM family markers are conserved among hematopoietic stem cells from old and reconstituted mice and markedly increase their purity // *Blood*. – 2006. – Vol.107. – P. 924–930.
- Ying Q.L., Nichols J., Chambers I. et al. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3 // *Cell*. – 2003. – Vol.115, №3. – P. 281–292.
- Zhang H., Vutskits L., Pepper M.S., Kiss J.Z. VEGF is a chemoattractant for FGF-2-stimulated neural progenitors // *J. Cell Biol.* – 2003. – Vol.163. – P. 1375–1384.
- Zhao T., Xu Y. p53 and stem cells: new developments and new concerns // *Trend in Cell Biology*. – 2010. – Vol.20, №3. – P. 170–175.

Представлено: Х.В.Михайленко / Presented by: Kh.V.Mikhaylenko

Рецензент: Н.В.Багацька / Reviewer: N.V.Bagatskaya

Подано до редакції / Received: 05.04.2013