

УДК: 591.331:616-08

КЛЕТКИ НЕРВНОГО ГРЕБНЯ И ИХ ПОТЕНЦИАЛЬНОЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Шевченко Е.Н.

<https://orcid.org/0000-0001-6788-4013>

katernabaker@gmail.com

Днепро́вский государственный медицинский университет, Днепр

Реферат. Нервный гребень (НГ) - это популяция клеток, образующийся на стыке ненейральной эктодермы и нервной трубки. Предшественники нервного гребня обладают мультипотентностью, способностью к самообновлению и обширной миграции. Они могут дифференцироваться в различные типы клеток от черепно-лицевых скелетных тканей до компонентов периферической нервной системы. Под влиянием сигнальных молекул и факторов транскрипции, которые экспрессируются на разных стадиях, происходит регуляция развития НГ. Регуляторная сеть генов определяет процессы индукции, спецификации, миграции и дифференциации клеток нервного гребня (КНГ). Целью статьи является сравнение характеристик КНГ, полученных из тканей эмбриона, плода и взрослого человека; экспериментальные стратегии для получения КНГ из эмбриональные стволовых клеток, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, фибробластов кожи; а так же сравнение потенциала разных типов клеток для терапевтического применения в клинических условиях. Эмбриональные стволовые КНГ в зависимости от области, из которой они мигрируют, подразделяются на туловищные, краниальные, сердечные, околопочечные и вагусные. Зрелые стволовые КНГ могут быть выделены из ганглиев дорсальных корешков, красного костного мозга, волосяного фолликула, кожи, кишечника, каротидного тела, сердца, роговицы, радужки, пульпы зуба, твердого неба и слизистой оболочки ротовой полости. Генетические мутации могут привести к нарушению регуляции

развития НГ, что приводит ко многим врожденным заболеваниям человека, таким как сердечно-сосудистые дефекты, черепно-лицевые аномалии и кишечный аганглиоз, известные под общим названием нейрокриптопатии. Идентификация и выделение мультипотентных стволовых КНГ, полученных из взрослых тканей, эмбриональных стволовых клеток, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток являются перспективными направлениями регенеративной медицины.

Ключевые слова: производные нервного гребня, стволовые клетки нервного гребня, зрелые стволовые клетки, мультипотентные стволовые клетки, регенеративная медицина.

Клітини нервового гребеня та їх потенційне терапевтичне застосування

Шевченко К.М.

Дніпровський державний медичний університет, Дніпро

Реферат. Нервовий гребінь (НГ) - це популяція клітин, що утворюється на стику ненейральної ектодерми і нервової трубки. Попередники нервового гребеня є мультипотентними, мають здатність до обширної міграції та самовідновлення. Вони можуть диференціюватися в різні типи клітин від черепно-лицьових скелетних тканин до компонентів периферичної нервової системи. Під впливом сигнальних молекул і факторів транскрипції, які експресуються на різних стадіях, відбувається регуляція розвитку НГ. Регуляторна мережа генів визначає процеси індукції, специфікації, міграції та диференціації клітин нервового гребеня (КНГ). Метою статті є порівняння характеристик КНГ, отриманих з тканин ембріона, плода і дорослої людини; експериментальні стратегії для отримання КНГ з ембріональні стовбурових клітин, індукованих плюрипотентних стовбурових клітин, фібробластів шкіри; а також порівняння потенціалу різних типів клітин для терапевтичного застосування у клінічних умовах. Ембріональні стовбурові КНГ в залежності

від області, з якої вони мігрують, поділяються на тулубові, краніальні, серцеві, навкологлоткові та вагусні. Зрілі стовбурові КНГ можуть бути виділені з гангліїв дорсальних корінців, червоного кісткового мозку, волосяного фолікула, шкіри, кишковика, каротидного тіла, серця, рогівки, райдужки, пульпи зуба, твердого піднебіння і слизової оболонки ротової порожнини. Генетичні мутації можуть призвести до порушення регуляції розвитку НГ, що призводить до багатьох вроджених захворювань людини, таких як серцево-судинні дефекти, черепно-лицьові аномалії і кишковий агангліоз, відомі під загальною назвою нейрокристократії. Ідентифікація та виділення мультипотентних стовбурових КНГ, отриманих з дорослих тканин, ембріональних стовбурових клітин, індукованих плюрипотентних стовбурових клітин є перспективними напрямками регенеративної медицини.

Ключові слова: похідні нервового гребеня, стовбурові клітини нервового гребеня, зрілі стовбурові клітини, мультипотентні стовбурові клітини, регенеративна медицина.

Neural crest cells and their potential therapeutic applications

Shevchenko K.M.

Dnipro State Medical University, Dnipro

Abstract. Neural crest (NC) is a population of cells, formed at the intersection between non-neural ectoderm and neural tube. Neural crest progenitors are multipotent, have capacity to extensive migration and self-renewal. They can be differentiated into various cells types from craniofacial skeletal tissues to components of peripheral nervous system. Influence of signaling molecules and transcription factors, which are expressed at the different stages regulate development of NC. The regulatory network of genes determines the processes of induction, specification, migration and differentiation of neural crest cells (NCC). The purpose of this article is to compare the characteristics of NCC, obtained from tissues of the embryo, fetus and adult; experimental strategies for obtaining NCC from embryonic stem cells,

induced pluripotent stem cells, skin fibroblasts; comparison of the potential of different cell types for therapeutic use in a clinical setting. Embryonic stem NCC are differentiated to the trunk, cranial, cardiac, circumpharyngeal and vagal according to the area of their initial migration. Mature stem NCC can be obtained from the dorsal root ganglia, red bone marrow, hair follicle, skin, intestines, carotid body, heart, cornea, iris, dental pulp, hard palate and oral mucosa. Genetic mutations may lead to failure of regulation of NC development, which leads to many congenital human diseases such as cardiovascular defects, craniofacial abnormalities and intestinal aganglionosis, collectively known as neurocristopathies. The identification and isolation of multipotent stem NCC derived from adult tissues, embryonic stem cells, and induced pluripotent stem cells are promising source for regenerative medicine.

Key words: neural crest derivatives, neural crest stem cells, adult stem cells, multipotent stem cells, regenerative medicine.

Введение

Нервный гребень (НГ) представляет собой временную популяцию клеток, которые в ходе гаструляции образуются на границе нервной пластинки в результате индуктивного воздействия ненейральной эктодермы и подлежащей мезодермы. Эти клетки в дальнейшем проходят процесс эпителио-мезенхимальной трансформации, при котором изменяются межклеточная адгезия и цитоархитектура, что приводит к миграции в направлении мезенхимы, поскольку они обособляются от дорсального нейроэпителия. Развитие НГ задействует каскад сигнальных молекул, таких, как bone morphogenetic proteins (BMPs), Wnts, Fibroblast growth factor, запускающих программу транскрипции генов, которые определяют процессы на разных этапах развития.

В соответствии с исходным расположением и влиянием сигнальных молекул, клетки нервного гребня (КНГ) мигрируют в различные участки тела эмбриона, где они могут дифференцироваться в разные типы клеток, включая

эктомезенхимальные ткани (хрящевая и костная), чувствительные нейроны и кишечные ганглии периферической нервной системы [1].

Существует корреляция между временем миграции КНГ и их потенциалом развития. Клетки, которые мигрируют первыми, способны дифференцироваться во многие типы клеток. Клетки, мигрирующие позже, образуют только производные, характерные для дорзальных участков (например, спинномозговые ганглии), за исключением симпатических нейронов и клеток мозгового вещества надпочечников. Клетки, которые мигрируют из нервной трубки последними, дают начало только пигментным клеткам [2].

Цель – классификация клеток нервного гребня, а так же сравнение потенциалов различных типов клеток для использования в практической медицине.

ТИПЫ КНГ

КНГ в зависимости от области, из которой они мигрируют (краниокаудальная, передний мозг, будущая крестцовая), подразделяются на туловищные, краниальные, сердечные, окологлочные, вагусные [3].

Туловищные КНГ

Туловищный НГ распространяется от шестого сомита к наиболее каудальным сомитам. Выделяют три пути миграции клеток, которые протекают в разной последовательности. Первые КНГ мигрируют вокруг сомитов, сопровождая межсомитные кровеносные сосуды, достигают области дорсальной аорты. Эти клетки образуют предшественники симпатоадреналовой линии.

В дальнейшем происходит разделение сомитов на склеротомный и дерматомный участки. КНГ, мигрирующие из передней части склеротомов ветролатерально, образуют спинномозговые ганглии, в состав которых входят

сенсорные нейроны и сателлитоциты. И наконец, дорзолатеральное направление миграции клеток под кожу, дает начало меланоцитам.

Симптоадренальная линия происходит из симптоадренальной клетки-предшественника, которая дает начало четырем типам клеток: хромоаффинные клетки надпочечников, клетки симпатических ганглиев; адренергический симпатические нейроны и небольшая популяция холинергических симпатических нейронов.

Развитие вегетативной нервной системы (симпатический и парасимпатический отдел) зависит от взаимодействия двух ДНК-связывающих белков: Phox-2 (гомеодоменовый белок) и Mash-1 (фактор транскрипции). Воздействие BMPs, выделяющегося из дорзальной стенки аорты, вокруг которой эти клетки сосредоточены, ограничивает дальнейшее преобразование этой клеточной линии в бипотентную клетку-предшественницу, дающую начало хромоаффинным клеткам надпочечников или симпатическим нейронам [4]. Бипотентная клетка-предшественник уже обладает некоторыми нейрональными характеристиками, однако окончательная дифференцировка зависит от окружающей среды, в которую эти клетки попадают.

Дифференциация в симпатические ганглии происходит под влиянием сигналов, которые выделяются со стороны вентральной части нервной трубки, хорды и сомитов. К этим сигналам относятся норэпинефрин, продуцирующийся хордой и BMP - спинной аортой. Клетки-предшественники в развивающемся мозговом веществе надпочечников сталкиваются с глюкокортикоидами, секретируемые клетками коркового вещества надпочечников. Это гормональное воздействие приводит к потере клетками нейрональных свойств и дальнейшей дифференцировке в хромоаффинные клетки [5].

Во всех отделах кишечника находятся клетки-производные нервного гребня: парасимпатические нейроны и кишечные глиоциты. Они возникают из КНГ, расположенных на уровне шейного (вагусного) и крестцового отдела и, под влиянием нейротрофического фактора глиального происхождения,

мигрируют вдоль развивающегося кишечника. Клетки крестцового нервного гребня колонизируют дистальные отделы кишечника, но и там они образуют лишь несколько кишечных нейронов. Остальные развиваются из вагусного гребня.

Клетки **сенсорной линии** формируют чувствительные ганглии (дорсальный корешок) и несколько типов клеток, обнаруженных в ганглиях (нейроны, клетки Шванна, сателлитные клетки). Воздействие Wnt / catenin приводит к образованию сенсорных нейронов, тогда как глиальный фактор роста (нейрегулин) способствует дифференцировке клеток Шванна. Отростки нейронов, которые в дальнейшем образуют ганглии [3], взаимодействуют как с задними рогами спинного мозга, так и с нервными окончаниями органов.

Особенностью **меланоцитов** является то, что они происходят только из одного типа клеток, а клетки-предшественники меланоцитов дифференцируются либо до, либо сразу после их миграции из нервной трубки [3]. Под действием сигнальных молекул Wnt и эндотелина, происходит экспрессия фактора транскрипции Mitf. Как было упомянуто ранее, клетки-предшественники меланоцитов мигрируют дорзолатерально и распределяются в дерматоме сомитов под действием фактора Steel.

Туловищные КНГ обладают более ограниченным потенциалом дифференциации по сравнению с краниальными клетками.

Краниальные КНГ

Сравнительные исследования показывают, что краниальный НГ является основным морфологическим субстратом для развития структур головы у позвоночных [6]. У млекопитающих КНГ покидают будущий мозг задолго до закрытия нервных складок.

Развитие НГ в области переднего мозга угнетается сигнальной молекулой Dickkopf 1, которая секретируется прилежащей прехордальной мезодермой. Специфические потоки клеток нервного гребня, происходящие из заднего

мозга, заселяют первые три глоточные дуги. Для миграции клеток краниального НГ характерен пространственно-временной порядок с их четкими конечными пунктами распределения в голове и шеи.

Главное функциональное разделение краниального НГ происходит на границе между ромбомерами 3 (r3) и 4 (r4). КНГ, выходящие из промежуточного мозга сзади через r3, не экспрессируют никаких генов, тогда как клетки, образующиеся из области заднего мозга, впоследствии экспрессируют хорошо упорядоченную последовательность гена *Нох*. Существует тесная связь между происхождением НГ в заднем мозге, его окончательным местом распределения в области глоточных дуг и экспрессией определенных генов. КНГ r1 и r2, мигрируют и образуют основную часть первой глоточной дуги, КНГ r4 – вторую дуги, КНГ r6 и r7 – третью дуги. КНГ расходящиеся небольшими потоками от r3, входят в первую и вторую глоточные дуги. Клетки из r5 ведут себя аналогично, сливаясь с потоками КНГ, исходящих от r4 и r6. Существует прямая корреляция между характером миграции ромбомерных КНГ и продуктами экспрессии генов *Нохb*. Продукты *Нохb-2*, *Нохb-3* и *Нохb-4* экспрессируются в четкой последовательности в нервной трубке и мезенхиме, происходящей из НГ второй, третьей и четвертой глоточных дуг. *Нохb* не экспрессируется в r1 и r2 или в мезенхиме первой глоточной дуги. Только после заселения глоточных дуг КНГ эктодерма, покрывающая дуги, экспрессирует аналогичный паттерн продуктов гена *Нохb*.

Мигрирующие клетки краниального НГ представляют собой смешанную популяцию, чья судьба либо уже определена или будет определена окружающей средой, в которую они попадут. Покидая мозг, клетки краниального гребня мигрируют в виде пластов рострально или потоков в дорсолатерально (область глотки) непосредственно под эктодерму. По мере приближения к глоточным дугам, особенно ко второй дуге, ведущие КНГ привлекаются эндотельным фактор роста сосудов (VEGF), который является хемоаттрактантом, продуцируемым дистальной эктодермой. Замыкающие

клетки в потоке связаны между собой длинными филоподиями и следуют за ведущими клетками по мере их движения, расходясь в самих глоточных дугах.

Клетки черепного нервного гребня дифференцируются в различные типы клеток и тканей (см. таб. 1), которые составляют большую часть мягких и твердых тканей лица.

Сердечные КНГ

Сердечный гребень, возникающий на уровне 1–3 сомитов, окружает эндотелиальные предшественники третьей, четвертой, шестой дуги аорты и вносит значительный вклад в образование конусовидных гребней, которые разделяют выпускной тракт на аортальный и легочный сегменты. Сердечный НГ может взаимодействовать с глоточной энтодермой, чтобы привнести сигналы, ведущие к нормальной дифференцировке клеток миокарда.

Несмотря на то, что большая часть сердечного гребня принимает участие в формировании выпускного тракта сердца и магистральных сосудов, часть клеток связывается с новообразованным тимусом, паращитовидной и щитовидной желез. Выделяют две волны миграции клеток сердечного НГ: клетки первой волны, в основном, принимают участие в формировании выпускного тракта сердца и артерий дуги аорты, тогда как клетки более поздних волны встраиваются в глоточные железы. На пути к сердцу и структурам глотки, клетки сердечного гребня мигрируют по дорсолатеральному пути и достигают места назначения через окологлоточный гребень. Некоторые клетки НГ мигрируют вентрально в глотку и встраиваются в миобласты, которые мигрируют из сомитов краниально, и в дальнейшем формируют собственные мышцы языка и нижние фарингеальные мышцы. Это единственный известный случай, когда мышцы, происходящие из сомитов, соединяются с соединительной тканью нервного гребня. Сердечный НГ также принимает участие в формировании клеток Шванна, обнаруживаемых в подъязычных и других черепных нервах [7].

Окологлоточные КНГ

Около глоточный НГ происходит из в заднего отдела ромбэнцефалической области на уровне 1-7 сомитов. Эта область представляет является промежуточной между черепным и туловищным НГ. Клетки, возникающие на уровне первых четырех сомитов, больше похожи на краниальный гребень, тогда как мигрирующие на уровнях 5-7 сомитов, более характерные для туловищного гребня. Видимым ориентиром в этой области является окологлоточный гребень, дугообразное скопление клеток, которое проходит за шестой глоточной дугой. Вентрально к глотке, этот гребень протягивается краниально и обеспечивает путь, по которому проходят подъязычный нерв (XII) и связанные с ним предшественники скелетных мышц. Большинство клеток НГ проходит от уровня 1 – 3 сомитов либо в выпускной тракт сердца, либо в четвертую и шестую глоточные дуги. Эти клетки являются сердечным гребнем. Другие клетки на этом уровне, а также возникающие из уровня сомитов 4 - 7, называются вагусным гребнем. Эти клетки мигрируют в кишечник в качестве предшественников парасимпатической иннервации пищеварительного тракта. Они также образуют сенсорные нейроны и глию, а также принимают участие в образовании симпатических ганглиев [3]. Подобно клеткам краниального гребня, большинство клеток сердечного гребня мигрируют дорсолатерально между сомитами и эктодермой, тогда как вагусный и туловищный гребни первоначально мигрируют вентрально между нервной трубкой и дерматомом.

Вагусные КНГ

В кишечнике клетки нервного гребня образуют кишечную нервную систему, которая во многом выступает как самостоятельный компонент нервной системы. Количество кишечных нейронов практически идентично количеству нейронов в спинном мозге, и большинство этих нейронов не связаны напрямую ни с головным, ни со спинным мозгом. Эта автономность объясняет, как кишечник может поддерживать рефлекторную активность при

отсутствии непосредственного влияния со стороны центральной нервной системы.

Клетки, образующие нейроны кишечной нервной системы происходят от части окологлоточного гребня, известной как вагусный гребень. Эти клетки мигрируют из 1 - 7 сомитов, проходя вентральным путем через дорсальную часть окологлоточного гребня, а затем двигаются каудально по направлению к шестой глоточной дуге. Большинство этих клеток тесно связаны с кишечником эмбриона, но некоторые из них участвуют в формировании сенсорных ганглиев задних корешков и связанной с ними глии. На уровне 7 сомита эти клетки вносят свой вклад образование симпатических ганглиев. Клетки НГ не участвуют в формировании кишечной нервной ткани до момента, когда они покидают спинной мозг. Экспериментальным путем было доказано [8], что при замещении вагусного гребня клетками туловищного НГ, который обычно не образует клеток, ассоциированных с кишечником, кишечник заселялся трансплантированными клетками туловищного НГ. Несмотря на сильное влияние среды кишечника на развитие КНГ, последние сохраняют высокую пластичность в отношении дифференцировки. В ходе эксперимента при повторной трансплантации клеток-производные НГ из кишечника эмбрионов птиц в туловищную область более молодых эмбрионов, они теряли связь с кишечником.

Клетки вагусного НГ проходят по направлениям, которые являются общими с туловищными клетками (например, надпочечник или периферический нерв, за исключением пути пигментных клеток) и развиваются соответственно. Под влиянием нейротрофического фактора глиального происхождения (GDNF) клетки вагусного гребня входят в переднюю область передней кишки и начинают заполнять кишечник. Одной из возможных причин того, что КНГ в области туловища не могут попасть в кишечник, заключается в том, что клетки брыжейки возле кишечника экспрессируют молекулу Slit-2, которая также не позволяет нейронам пересекать границу центральной нервной

системы. Туловищные КНГ экспрессируют Slit рецептор Robo, тем самым заставляя их избегать клеток, экспрессирующих Slit. Клетки вагусного гребня не экспрессируют Robo и имеют доступ к стенке кишечника.

Клетки вагусного гребня, вторгаясь в стенку кишечника, распространяются по всей его длине, и в конечном итоге останавливаются около заднего конца задней кишки к концу седьмой недели беременности. Клетки-предшественники нейронов кишечника, которые позже становятся парасимпатическими нейронами, продвигаются вниз по кишечнику. Эти клетки продвигаются как взаимосвязанные пряди, и затем пролиферируют. Продвижение распространение клеточного потока по большей части является результатом деления и роста клеточного потомства НГ в незаселенных областях кишечника, чем фактическая направленная миграция отдельных клеток. В толстой кишке Клетки вагусного гребня в конечном итоге встречаются с меньшим количеством клеток, после чего клеточная миграция прекращается, и продолжают дальнейшая формирование кишечных ганглиев. Во время первой колонизации кишечника, клетки НГ не экспрессируют нейрональные маркеры, но под влиянием Hand-2 волна дифференцировки проходит по кишечнику, и клетки синтезируют белки нейрофиламентов и впервые проявляют катехоламинергические признаки [3]. Эти клетки образуют миэнтерические сплетения.

Таблица 1. Производные нервного гребня

	Туловищные КНГ	Краниальные и окологлоточные КНГ
Нервная система		
Сенсорные отделы нервной системы	Спинномозговые ганглии, сателлиты чувствительных	Ганглии тройничного нерва (V), лицевого нерва (VII), языкоглоточного нерва,

	ганглия, Шванновские клетки всех периферических нервов, глиальные клетки кишечника, клетки Меркеля	блуждающего нерва (верхний ганглий) (IX), блуждающий нерв (яремный ганглий) (X), сателлиты чувствительных Ганглиев, Шванновские клетки периферических нервов
Автономная нервная система	Симпатические ганглии, кишечные и брыжеечные ганглии Парасимпатические ганглии: тазовые и висцеральные сплетения	Парасимпатические ганглии: ресничный, решетчатый, клиновидно-небный, поднижнечелюстной, висцеральный
Мозговые оболочки	-	Мозговые оболочки переднего и среднего мозга
Пигментные клетки	Меланоциты	Меланоциты
Эндокринные и Паракринные Клетки	Мозговое вещество надпочечников, нейросекреторные клетки сердца и легких	Каротидное тело (клетки типа I), парафолликулярные клетки (щитовидная железа)
Мезэктодермальные клетки		
Скелетные ткани	-	Свод черепа (чешуйчатый шов и лобная часть), область носа и глазниц,

		<p>оптическая капсула (частично), небо и верхняя челюсть, нижняя челюсть, клиновидная (незначительно), трабекулы (частично), висцеральные хрящи, хрящ наружного уха (частично)</p>
Соединительные ткани	-	<p>Дерма и подкожно-жировая клетчатка; роговица глаза (фибробласты стромы и эпителия роговицы); зубной сосочек (одонтобласты); соединительная ткань строма желез: щитовидная, паращитовидная, тимус, слюнная, слезная; выпускной тракт (туловищная область) сердца; сердечные полулунные клапаны; стенки аорты и артерий дуги аорты; адипоциты</p>
Мышечные ткани	-	<p>Ресничные мышцы, гладкие мышцы кожи,</p>

		гладкие мышцы сосудов, некоторые элементы скелетных мышц
--	--	---

Генетические мутации могут привести к нарушению регуляции развития НГ, что приводит ко многим врожденным заболеваниям человека, таким как сердечно-сосудистые дефекты, черепно-лицевые аномалии и кишечный аганглиоз, известные под общим названием нейрокриптопатии [6].

Идентификация и выделение мультипотентных СКНГ, полученных из взрослых тканей, эмбриональных стволовых клеток, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, а также фибробластов кожи являются перспективными источниками для лечения нейрокриптопатий.

Потенциал развития клеток-предшественников НГ

Потенциал дифференцировки КНГ лежит в основе их мультипотентности. Туловищные КНГ из ствола дифференцируются в симпатические нейроны, которые производят нейромедиатор норадреналин, тогда как краниальные КНГ дают начало парасимпатическим нейронам, которые производят ацетилхолин. В эксперименте с куро-перепелиными химерами [9], было показано, что туловищные КНГ, трансплантированные в участки головы, дифференцировались в холинергические парасимпатические нейроны вместо адренергических. И наоборот, краниальные КНГ, пересаженные в туловищный отдел, реагируя на новую среду, образовывали адренергические симпатические нейроны.

Более ярким примером является превращение окологлазничных клеток мезенхимы НГ (которые у птиц в норме образуют хрящи) в нейроны в ходе взаимодействия с эмбриональной тканью задней кишки *in vitro* [10]. Многие локальные факторы, влияющие на дифференциацию популяций КНГ, являются

результатом взаимодействия между мигрирующими клетками и определенными тканями, с которыми они встречаются во время миграции.

Пластичность дифференцировки клеток нервного гребня может быть продемонстрирована на примере клонирования отдельных клеток НГ [11]. В одной и той же среде с одинаковыми условиями окружающей среды потомство клонированных клеток дифференцировалось как на нейронные, так и ненейронные (например, пигментные клетки) типы. Аналогично, при введении КНГ в культуру тканей с красителем, более 50% клеток давали начало от двух до четырех различным фенотипам, которые были окрашены красителем [12]. Очевидно, что условия окружающей среды влияют на механизмы, определяющие фенотип клонированных нейронных клеток-предшественников гребня. В эксперименте КНГ крысы, выращенные в стандартных условиях *in vitro*, дифференцировались в нейроны, однако под влиянием глиального фактора роста они развивались в клетки Шванна, поскольку данный фактор подавлял их превращение в нейроны [13].

Производные НГ имеют ограниченный потенциал дальнейших преобразований. Клетки туловищного НГ, трансплантированные в голову, не могут образовывать хрящевые или скелетные ткани, что характерно для краниальных КНГ. Большинство экспериментов показывают, что рано мигрирующие КНГ, разделяются на промежуточные линии, сохраняющие возможность дифференциации в несколько, но не во все фенотипы клеток.

Зрелые стволовые КНГ и их потенциал регенерации

Стволовые КНГ были обнаружены не только у эмбрионов, но и у взрослых особей: в ганглиях дорсальных корешков, [14], костном мозге [15], волосяном фолликуле [16], коже [17, 18], кишечнике [19], каротидном теле [20], сердце [21], а также некоторых тканях черепа, в частности, роговице [22], радужке [23], пульпе зуба [24], твердом небе [25] и слизистой оболочке ротовой полости [26]. Выявленные в ходе предыдущих исследований стволовые КНГ в

составе зрелых тканей представляют собой потенциальные источники клеток для заместительной терапии.

Клетки-производные каротидного тела

Каротидное тело представляет собой терапевтически значимый потенциальный источник клеток. Это чувствительный к кислороду орган, расположенный на бифуркации сонной артерии, который содержит кластеры кислород-чувствительных нейрноподобных клеток, окруженных глиальными клетками. Исследования по отслеживанию генетического происхождения с использованием Wnt1-Cre линии продемонстрировала, что глиальные клетки были мультипотентными стволовыми клетками-производными НГ. Эти клетки каротидного тела способны к самообновлению и дифференцировке в дофаминергические нейроны и гладкомышечные клетки как *in vitro*, так и *in vivo*. Из-за высокой дофаминергической природы нейрноподобные клетки успешно использовались в исследованиях на животных с моделированной болезнью Паркинсона для трансплантации с многообещающими результатами [27]. Однако небольшой объем доступной ткани каротидного тела ограничивает его использование. Культивирование предшественников каротидного тела *in vitro* из резидентных взрослых стволовых клеток может обеспечить достаточное количество клеток для дифференцировки клетки для лечения болезни Паркинсона. Эти исследования впервые продемонстрировали потенциальное физиологическое применение взрослых КНГ *in vivo*.

Клетки-производные сердца

Сердечные КНГ участвуют в формировании перегородки выпускного тракта между аортой и легочной артерией. Кроме того, было обнаружено, что у новорожденных и взрослых грызунов клетки, диссоциированные от кардиосфер, могут дифференцироваться в такие производные КГ, как нейроны ПНС, глиоциты, гладкомышечные клетки, кардиомиоциты.

В исследовании [28, 29] клетки-резиденты сердечных предшественников мигрировали в область ишемического повреждения миокарда, что способствовало восстановлению васкуляризации. Следовательно, понимание молекулярной регуляции, связанной с установлением и поддержанием популяции этих стволовых клеток, а также механизма дифференцировки в ткани-мишени, представляет важное терапевтическое значение для лечения различных сердечных заболеваний.

Клетки-производные кишечника

Иммунофлуоресцентное окрашивание показало, что только 44% клеток кишечника взрослых грызунов образовали мультипотентные первичные нейросферы в культуре, что указывает на гетерогенность кишечной глии взрослых [30]. Однако, мультипотентные фетальные клетки-предшественники, полученные из кишечника, демонстрировали большую степень самообновления и дифференцировки по сравнению со взрослыми [31]. После трансплантации куриным эмбрионам незрелые клетки давали начало в основном нейронам, тогда как клетки более дифференцированные – преимущественно клетки глии [32]. Дальнейшее изучение физиологической роли КНГ кишечника взрослого человека показало, что в после травмы они образовывали в основном глию, а не нейроны [30]. Вживление кишечных КНГ в толстую кишку плода или новорожденных мышей *in vivo* показало, что клетки, полученные из этих популяций, могут мигрировать, размножаться и генерировать ганглиеподобные кластеры с нейрохимическими, морфологическими и электрофизиологическими свойствами кишечных нейронов, с синаптическими свойствами [33]. Эти исследования показали, что клетки-предшественники, изолированные из кишечника новорожденных имеют терапевтический потенциал для лечения заболеваний, связанных с нарушением иннервации кишечника. Однако данная концепция для лечения кишечных невропатий у взрослых требует дополнительных исследований.

Клетки-производные кожи

Идентификация и получение мультипотентных клеток из кожи взрослых грызунов и людей является важным открытием в области стволовых клеток, поскольку кожная ткань наиболее удобна в доступе [17, 34, 35]. Исследования клеток-предшественниковкожи мышей, находящиеся в основании волосяных фолликулов на лице и дермальных сосочков, доказали, их происхождение из НГ [34, 35]. Они обладают способностью к самообновлению и дифференцировке в нейроны, гладкомышечные клетки, клетки Шванна и меланоциты *in vitro*. Кроме того, трансплантация клеток-производных кожи в куриные эмбрионы показала, что они рассредоточились по миграционным маршрутам НГ и колонизировали структуры, происходящие из НГ, такие как дорзальный нервный ганглий и периферический нерв [34].

Еще одна популяция мультипотентных клеток-производных НГ – эпидермальные стволовые клетки НГ, обнаруженные в области фолликулов усов у взрослых мышей [35, 36]. Несмотря на разную локализацию, эти клетки, как и клетки-производные кожи, обладают способностью к самообновлению и дифференцировке в различные производные НГ. В экспериментальных моделях повреждения спинного мозга у мышей было обнаружено, что трансплантированные мышинные эпидермальные КНГ интегрировались с окружающей тканью позвоночника, что приводило к значительному улучшению сенсорной связи и тактильной рецепции [37]. Важно отметить, что эпидермальные стволовые КНГ не образуют опухоли в месте пересадки, что является важной предпосылкой для лечения. Шванновские клетки, происходящие из НГ, представляют собой глиальные клетки ПНС, ответственные за миелинизацию и обволакивание аксонов, а также восстановление тканей после тяжелого повреждения нервов при травме спинного мозга. Исследования показали, что трансплантация клеток Шванна, была более эффективна по сравнению с клетками-производными кожи в отношении восстановления после травм позвоночника [38].

У человека эпидермальные стволовые КНГ, расположенные в области волосяного фолликула, являются мультипотентными, и могут подвергаться самообновлению и давать начало всем основным производным НГ, включая нейроны, остеобласты / хондроциты, клетки Шванна и гладкие миоциты [39]. Важной особенностью является то, что, несмотря на экспрессию гены стволовых клеток, они не образуют опухолей, что выгодно отличает их среди других источников для заместительной терапии. Эпидермальные стволовые КНГ человека могут быть дифференцированы в клинически значимые клетки типы, включая костные клетки, дофаминергические нейроны среднего мозга [40] и клетки Шванна, которые могут использоваться для регенерации нервов [41].

Роговица

Роговица, представляет собой прозрачную бессосудистую структуру, которая покрывает переднюю часть глаза и вместе с линзой помогает фокусировать свет на сетчатке. Она состоит из трех основных клеточных компонентов: многослойного эпителия, толстой коллагеновой стромы, содержащей кератоциты, и однослойного эндотелия. В эксперименте с химерами цыплят и перепелов был доказан вклад краниальных стволовых клеток НГ в развитие эндотелия и кератоцитов роговицы за счет продукции кератансульфата протеогликанов, которые взаимодействуют с коллагеном стромы и необходимы для поддержания ее прозрачности [42]. В норме кератоциты делятся только у плода, в дальнейшем покидая клеточный цикл, утрачивают данную способность. Однако в ответ на травму непролиферирующие кератоциты могут возобновить миграцию, митоз, восстановление посредством повторной экспрессии и секреции внеклеточного матрикса, определяя клеточную пластичность [43]. Это было продемонстрировано при трансплантации кератиноцитов, полученных из НГ поздних эмбрионов перепелов в ранние куриные эмбрионы. В ходе эксперимента клетки, проходя типичные пути миграции, дифференцировались

в такие производные НГ, как гладкие мышцы, миофибриллы, кератоциты и эндотелиальные клетки за исключением нейронов краниальных ганглиев и хрящей жаберных дуг, что позволяет предположить, что кератоциты стромы обладают ограниченным потенциалом дальнейших превращений [44]. Это исследование показало, что кератоциты не дифференцируются окончательно, обладая пластичностью и мультипотентностью. Стромальные стволовые клетки роговицы человека, присутствующие в лимбе, также обладают способностью к самообновлению и широким потенциалом дифференцировки [45]. Важно отметить, что трансплантированные эти клетки не вызывают иммунного отторжения, опосредованного Т-клетками, что делает их идеальными для аллогенной трансплантации для лечения рубцов стромы.

Радужная оболочка глаза

Клетки-производные радужки у мышей, экспрессируя гены-маркеры нервных стволовых клеток и КНГ, способны дифференцироваться в нейроны, глию, гладкие мышцы и хондроциты [46].

Эти мультипотентные стволовые клетки, производные НГ можно выделить из радужки мышей и культивировать, что делает их потенциальными источниками клеток для регенеративной терапии заболеваний глаза.

Зубы

Еще один доступный источник стволовых клеток НГ может быть получен из пульпы зуба и периодонтальной связки.

В ходе прорезывания зубов, популяция стволовых клеток пульпы зуба дифференцируются на одонтобласты с образованием репаративного дентина, который защищает пульпу зуба от деградации [47, 24]. Эти клетки являются мультипотентными и способны дифференцироваться в хондроциты, адипоциты, одонтобласты и нейроподобные клетки *in vitro*, а также образуют эктопический дентин и связанную с ним ткань пульпы *in vivo* [48]. Стволовые клетки пульпы зуба могут также дифференцироваться на другие клинически

значимые типы клеток *in vitro*, такие как нейроны [49] и клетки островков Лангерганса [50], что является потенциалом для регенеративной терапии неврологических расстройств и сахарного диабета.

Периодонтальная связка содержит мультипотентные КНГ, способные самообновляться и дифференцировать в нервные и мезенхимальные линии [51]. В благоприятных условиях культивирование этих клеток дает начало инсулин-продуцирующим клеткам поджелудочной железы [52]. Кроме того, стволовые клетки периодонтальной связки, могут быть использованы для создания предшественников сетчатки, направленных на дифференцировку фоторецепторов, что лежит в основе их терапевтического потенциала в регенерации клеток сетчатки [53].

Небо

В ходе эксперимента было показано, что в небе взрослых крыс содержит клетки, связанные с НГ, которые могли дифференцироваться в нейроны и глиальные клетки [25].

Слизистая оболочка ротовой полости

Недавнее исследование показало, что клетки, выделенные из слизистой оболочки ротовой полости человека, были способны к самообновлению и экспрессировали гены, связанные с НГ [54]. Эти клетки слизистой оболочки полости рта человека были мультипотентными и способны дифференцироваться в линии НГ *in vitro* и формировать костные ткани *in vivo*, что указывает на то, что они могут быть потенциальным источником для регенерации костной ткани

Заключение

В связи с развитием молекулярной биологии генетики в настоящее время появилось большое количество научных статей, посвященных исследованию механизмов развития, миграции, дифференцировки клеток-предшественников

НГ. Это позволило понять механизмы, лежащие в основе возникновения опухолей, связанные с НГ, а также потенциал клеток-предшественников НГ для заместительной терапии.

Стволовые КНГ, полученные из тел эмбрионов обладают большим потенциалом развития по сравнению со зрелыми клетками, однако их производные несут генные мутации, что делает невозможным их трансплантацию в организм реципиента. Потенциальное применение этих клеток возможно в случае их предшествующим пересадке культивированием *in vitro*.

Среди зрелых стволовых клеток наиболее перспективным источником в регенеративной медицине являются эпидермальные КНГ: они могут дифференцироваться в клетки хрящевой и костной тканей, нейроны, клетки Шванна, миофибробласты и меланоциты. Кроме того, ткань кожи наиболее доступной.

Еще одним легкими в отношении доступа являются клетки зуба. Стволовые клетки пульпы обладают нейрогенным потенциалом дифференцировки, что делает их перспективным источником для лечения заболеваний нервной системы, в том числе нейродегенеративных.

Несмотря на удачные полученные генетически скорректированные предшественники НГ для конкретной линии, все же необходимо использовать модели болезней животных, для оценки степень их интеграции после трансплантации, чтобы убедиться, что полученные из НГ клетки функционально стабильны в долгосрочной перспективе.

Литература

1. Soto J, Ding X, Wang A, Li S. Neural crest-like stem cells for tissue regeneration. *Stem Cells Transl Med.* 2021 May;10(5):681-693. doi: 10.1002/sctm.20-0361.

2. Zurkirchen L, Sommer L. Quo vadis: tracing the fate of neural crest cells. *Curr Opin Neurobiol.* 2017 Dec; 47:16-23. doi.:10.1016/j.conb.2017.07.001.
3. Liu J, Cheung M. Neural crest stem cells and their potential therapeutic applications. *Dev Biol.* 2016 Nov; 419(2):199-216. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.09.006.
4. Schneider C, Wicht H, Enderich J, Wegner M, Rohrer H. Bone morphogenetic proteins are required in vivo for the generation of sympathetic neurons. *Neuron.* 1999; 24:861-870.
5. Hari L, Brault V, Kleber M, Lee HY, Ille F, Leimeroth R, Paratore C, Suter U, Kemler R, Sommer L. Lineage-specific requirements of beta-catenin in neural crest development. *J. Cell Biol.* 2002; 159:867-880
6. Rocha M, Singh N, Ahsan K, Beiriger A, Prince VE. Neural crest development: insights from the zebrafish. *Dev Dyn.* 2020 Jan;249(1):88-111. doi: 10.1002/dvdy.122.
7. York JR, McCauley DW. The origin and evolution of vertebrate neural crest cells. *Open Biol.* 2020 Jan;10(1):190285. doi: 10.1098/rsob.190285.
8. Hutchins EJ, Kunttas E, Piacentino ML, Howard AGA 4th, Bronner ME, Uribe RA. Migration and diversification of the vagal neural crest. *Dev Biol.* 2018 Dec 1;444 Suppl 1(Suppl 1):S98-S109. doi: 10.1016/j.ydbio.2018.07.004.
9. Le Douarin NM, Renaud D, Teillet MA, Le Douarin GH. Cholinergic differentiation of presumptive adrenergic neuroblasts in interspecific chimeras after heterotopic transplantations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1975; 72:728-732.
10. Bronner-Fraser M, Fraser S. Developmental potential of avian trunk neural crest cells in situ. *Neuron,* 1989; 3:755-766.
11. Bronner-Fraser M, Sieber-Blum M, Cohen AM. Clonal analysis of the avian neural crest: migration and maturation of mixed neural crest clones injected into host chicken embryos. *J. Comp. Neurol.* 1980; 193:423-434.

12. Fraser SE, Bronner-Fraser M. Migrating neural crest cells in the trunk of the avian embryo are multipotent. *Development*. 1991; 112: 913-920.
13. Wiszniak S, Schwarz Q. Notch signalling defines dorsal root ganglia neuroglial fate choice during early neural crest cell migration. *BMC Neurosci*. 2019 Apr 29; 20(1):21. doi: 10.1186/s12868-019-0501-0.
14. Lee G, Kim H, Elkabetz Y, Al Shamy G, Panagiotakos G, Barberi T, Tabar V, Studer L. Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol*. 2007; 25:1468-1475.
15. Shi H, Gong Y, Qiang L, Li X, Zhang S, Gao J, Li K, Ji X, Tian L, Gu X, Ding F. Derivation of Schwann cell precursors from neural crest cells resident in bone marrow for cell therapy to improve peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*. 2016; 89:25-37.
16. Nagoshi N, Shibata S, Kubota, Nakamura M, Nagai Y, Satoh E, Morikawa S, Okada Y, Mabuchi Y, Katoh H, Okada S, Fukuda K, Suda T, Matsuzaki Y, Toyama Y, Okano H. Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell Stem Cell*. 2008; 2:392-403.
17. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat. Cell Biol*. 2001; 3:778-784.
18. Wong CE, Paratore C, Dours-Zimmermann MT, Rochat A, Pietri T, Suter U, Zimmermann DR, Dufour S, Thiery JP, Meijer D, Beermann F, Barrandon Y, Sommer L. Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. *J. Cell Biol*. 2006; 175:1005-1015.
19. Kruger GM, Mosher JT, Bixby S, Joseph N, Iwashita T, Morrison SJ.

Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron*. 2002; 35:657-669.

20. Pardal R, Ortega-Saenz P, Duran R, Lopez-Barneo J. Glia-like stem cells sustain physiologic neurogenesis in the adult mammalian carotid body. *Cell*. 2007; 131:364-377.

21. Tomita Y, Matsumura K, Wakamatsu Y, Matsuzaki Y, Shibuya I, Kawaguchi H, Ieda M, Kanakubo S, Shimazaki T, Ogawa S, Osumi N, Okano H, Fukuda K. Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *J. Cell Biol.* 2005; 170:1135-1146.

22. Brandl C, Florian C, Driemel O, Weber BH, Morsczech C. Identification of neural crest-derived stem cell-like cells from the corneal limbus of juvenile mice. *Exp. Eye Res.* 2009; 89:209-217.

23. Kikuchi M, Hayashi R, Kanakubo S, Ogasawara A, Yamato M, Osumi N, Nishida K. Neural crest-derived multipotent cells in the adult mouse iris stroma. *Genes Cells.* 2011; 16:273-281.

24. Janebodin K., Horst O. V., Ieronimakis N., Balasundaram G., Reesukumal K., Pratumvinit B., Reyes M. Isolation and characterization of neural crest-derived stem cells from dental pulp of neonatal mice // *PloS one*. 2011; 6(11): 6:e27526. DOI: 10.1371/journal.pone.0027526.

25. Widera D, Zander C, Heidebreder M, Kasperek Y, Noll T, Seitz O, Saldamli B, Sudhoff H, Sader R, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B. Adult palatum as a novel source of neural crest-related stem cells. *Stem Cells (Dayt., Ohio)*. 2009; 27:1899-1910.

26. Davies LC, Locke M, Webb RD, Roberts JT, Langley M, Thomas DW, Archer CW, Stephens P. A multipotent neural crest-derived progenitor cell

population is resident within the oral mucosa lamina propria. *Stem Cells Dev.* 2010; 19:819-830.

27. Munoz-Manchado AB, Villadiego J, Suarez-Luna N, Bermejo-Navas A, Garrido-Gil P, Labandeira-Garcia JL, Echevarria M, Lopez-Barneo J, Toledo-Aral JJ. Neuroprotective and reparative effects of carotid body grafts in a chronic MPTP model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging.* 2013; 34:902-915.

28. El-Helou V, Beguin PC, Assimakopoulos J, Clement R, Gosselin H, Brugada R, Aumont A, Biernaskie J, Villeneuve L, Leung TK, Fernandes KJ, Calderone A. The rat heart contains a neural stem cell population; role in sympathetic sprouting and angiogenesis. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2008; 45: 694-702.

29. El-Helou V, Chabot A, Gosselin H, Villeneuve L, Clavet-Lanthier ME, Tanguay JF, Enikolopov G, Fernandes KJ, Jasmin JF, A. Calderone Cardiac resident nestin(+) cells participate in reparative vascularization. *J Cell Physiol.* 2013; 228:1844-1853.

30. Joseph NM, He S, Quintana E, Kim YG, Nunez G, Morrison SJ. Enteric glia are multipotent in culture but primarily form glia in the adult rodent gut. *J. Clin. Investig.* 2011; 121:3398-3411.

31. Kruger GM, Mosher JT, Bixby S, Joseph N, Iwashita T, Morrison SJ.

Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron.* 2002; 35:657-669.

32. White PM, Anderson DJ. In vivo transplantation of mammalian neural crest cells into chick hosts reveals a new autonomic sublineage restriction. *Development.* 1999; 126:4351-4363.

33. Dettmann HM, Zhang Y, Wronna N, Kraushaar U, Guenther E, Mohr R, Neckel PH, Mack A, Fuchs J, Just L, Obermayr F. Isolation, expansion and

transplantation of postnatal murine progenitor cells of the enteric nervous system. *PLoS One*. 2014; 9:e97792.

34. Fernandes KJ, McKenzie IA, Mill P, Smith KM, Akhavan M, Barnabe-Heider F, Biernaskie J, Junek A, Kobayashi NR, Toma JG, Kaplan DR, Labosky PA, Rafuse V, Hui CC, Miller FD. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat. Cell Biol.* 2004; 6: 1082-1093.

35. Sieber-Blum M, Grim M, Hu YF, Szeder V. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. *Dev. Dyn.* 2004; 231:258-269.

36. Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, Nakamura M, Nagai Y, Satoh E, Morikawa S, Okada Y, Mabuchi Y, Katoh H, Okada S, Fukuda K, T. Suda K, Matsuzaki Y, Toyama Y, Okano H. Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell Stem Cell*. 2008; 2:392-403.

37. Sieber-Blum M, Schnell L, Grim M, Hu YF, Schneider R, Schwab ME. Characterization of epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC) grafts in the lesioned spinal cord. *Mol. Cell Neurosci.* 2006; 32:67-81.

38. Biernaskie J, Sparling JS, Liu J, Shannon CP, Plemel JR, Xie Y, Miller FD, Tetzlaff W. Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury. *J. Neurosci.* 2007; 27:9545-9559.

39. Clewes O, Narytnyk A, Gillinder KR, Loughney AD, Murdoch AP, Sieber-Blum M. Human epidermal neural crest stem cells (hEPI-NCSC)--characterization and directed differentiation into osteocytes and melanocytes. *Stem Cell Rev.* 2011; 7:799-814. DOI: 10.1007/s12015-011-9255-5.

40. Narytnyk A, Verdon B, Loughney A, Sweeney M, Clewes O, Taggart MJ, Sieber-Blum M. Differentiation of human epidermal neural crest stem cells

(hEPI-NCSC) into virtually homogenous populations of dopaminergic neurons. *Stem Cell Rev.* 2014; 10:316-326.

41. Sakaue M, Sieber-Blum M. Human epidermal neural crest stem cells as a source of Schwann cells. *Development.* 2015; 142:3188-3197.

42. Hassell JR, Birk DE. The molecular basis of corneal transparency. *Exp. Eye Res.* 2010; 91:326-335.

43. Fini. Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea ME. *Prog. Retin Eye Res.* 1999; 18:529-551.

44. Lwigale PY, Cressy PA, Bronner-Fraser M. Corneal keratocytes retain neural crest progenitor cell properties. *Dev. Biol.* 2005; 288:284-293.

45. Du Y, Funderburgh ML, Mann MM, SundarRaj N, Funderburgh JL. Multipotent stem cells in human corneal stroma. *Stem Cells.* 2005; 23:1266-1275.

46. Kikuchi M, Hayashi R, Kanakubo S, Ogasawara A, Yamato M, Osumi N, Nishida K. Neural crest-derived multipotent cells in the adult mouse iris stroma. *Genes Cells.* 2011; 16:273-281.

47. Huang GT, Shagramanova K, Chan SW. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. *J. Endod.* 2006; 32:1066-1073.

48. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, P. DenBesten A, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J. Dent. Res.* 2002;81:531-535.

49. Gervois P, Struys T, Hilkens P, Bronckaers A, Ratajczak J, Politis C, Brone B, Lambrichts I, Martens W. Neurogenic maturation of human dental pulp stem cells following neurosphere generation induces morphological and electrophysiological characteristics of functional neurons. *Stem Cells Dev.* 2015; 24:296-311.

50. Govindasamy V, Ronald VS, Abdullah AN, Nathan KR, Ab Aziz ZA, Abdullah M, Musa S, Kasim NH, Bhonde RR. Differentiation of dental pulp stem cells into islet-like aggregates. *J. Dent. Res.* 2011; 90:646-652.
51. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 2004; 364:149-155.
52. Huang CY, Pelaez D, Dominguez-Bendala J, Garcia-Godoy F, Cheung HS. Plasticity of stem cells derived from adult periodontal ligament. *Regen. Med.* 2009; 4:809-821.
53. Huang L, Liang J, Geng Y, Tsang WM, Yao X, Jhanji V, Zhang M, H.S. Cheung HS, Pang CP, Yam GH. Directing adult human periodontal ligament-derived stem cells to retinal fate. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2013; 54:3965-3974.
54. Abe S, Yamaguchi S, Sato Y, Harada K. Sphere-derived multipotent progenitor cells obtained from human oral mucosa are enriched in neural crest cells. *Stem Cells Transl. Med.* 2016; 5:117-128.