

А.В. Москалев, Б.Ю. Гумилевский,
А.В. Апчел, В.Н. Цыган

Стволовые клетки и их физиологические эффекты

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

Резюме. Представлена характеристика различных популяций стволовых клеток. Рассмотрены их физиологические особенности: дифференцировки, дедифференцировки, трансдифференцировки, пластичности, а также факторы, способствующие их проявлению. Широко освещена сравнительная характеристика эмбриональных и соматических стволовых клеток, которые наиболее близки к практическому применению. Показано, что эмбриональные стволовые клетки дифференцируются в три различных типа тканей: эндодерму, дающую начало внутренним органам, мезодерму, из которой развивается соединительная, мышечная и костная ткани, а также формируется система кровообращения, и эктодерму – производную кожи, органов чувств и нервных клеток. Из-за способности дифференцироваться в различные типы тканей эмбриональные стволовые клетки называют мультипотентными. Соматические стволовые клетки также способны к дифференциации, однако более ограниченной, чем эмбриональные. Соматические клетки одного типа способны давать начало другим типам клеток. Это свойство делает возможным применение соматических стволовых клеток для терапии и репарации больных и поврежденных тканей. Использование соматических стволовых клеток ограничивает то, что они труднее поддаются дифференциации и культивируются в лабораторных условиях хуже, чем эмбриональные. Подтверждено, что одним из самых ярко выраженных признаков способности клетки к пролонгированной пролиферативной активности является величина клеточной теломеры, непосредственно связанной с активностью фермента теломеразы. Чем активнее теломераза и длиннее теломера, тем к более длительной пролиферативной активности и к более длительному самоподдержанию способна данная клетка. Рассмотрены и охарактеризованы достоинства, недостатки и перспективы различных методик выделения и обогащения кроветворных стволовых клеток из периферической крови, костного мозга и пуповинной крови новорожденных, являющейся наиболее перспективным источником получения кроветворных стволовых клеток.

Ключевые слова: стволовая клетка, костный мозг, кроветворение, периферическая кровь, цитокины, факторы транскрипции, гены, фенотип, клеточная дифференцировка.

Интерес к стволовым клеткам появился в начале XX в. Отрадно, что первым, кто предложил термин «стволовые клетки», был профессор Военно-медицинской академии А.А. Максимов. Максимов Александр Александрович (04.02.1874–04.12.1928) – выдающийся русский ученый, один из создателей унитарной теории кроветворения. А.А. Максимов родился в Санкт-Петербурге, где в 1896 году с отличием окончил Военно-медицинскую академию. С 1903 по 1922 г. занимал пост профессора кафедры гистологии Военно-медицинской академии. Термин «стволовая клетка» А.А. Максимов предложил еще в 1908 г. в Берлине на съезде гематологов, где он выступил с новой теорией кроветворения для объяснения механизма быстрого самообновления крови. Именно этот год можно по праву считать началом истории развития исследований стволовых клеток (СК). А.А. Максимов первым пришел к выводу, что обновление клеток крови – это особая технология, отличная от простых клеточных делений. Если бы клетки крови самообновлялись простым клеточным делением, это потребовало бы гигантских размеров костного мозга [3, 5].

Первые эксперименты по практическому использованию СК были начаты еще в начале 1950-х годов. Именно тогда было доказано, что с помощью транс-

плантации костного мозга (основного источника СК) можно спасти животных, получивших смертельную дозу радиоактивного облучения. Однако поистине огромный интерес к СК проявился в конце XX – начале XXI вв. Это представляется вполне оправданным, ибо при целом ряде патологий, прежде всего при гемобластозах, трансплантация стволовых кроветворных клеток (СКК) является не альтернативным способом лечения больного, а его единственной и реальной надеждой. СКК обладают двумя ключевыми характеристиками: первая – неопределенная способность к самообновлению в культуре, вторая – очень широкий потенциал дифференциации для генерации всех типов клеток. Следовательно, теоретически, если можно эффективно вывести такие клетки и затем успешно провести ими генную терапию для исправления всех основных мутаций, вызывающих заболевание, то полученные клетки могут служить неисчерпаемым источником здоровых СК. Впоследствии они могут быть направлены на дифференцировку в любой необходимый тип клеток, который в конечном итоге может служить для восстановления поврежденной или пораженной ткани [1, 4, 11].

Известно, что СКК являются уникальным банком биоинформатики. СК могут копировать как построение органов и тканей (эмбриогенез), так и созревание

специализированных линий соматических клеток (дифференцировка). В настоящее время под термином «стволовые клетки» понимают клетки тканей, обладающих как минимум способностью к длительному самоподдержанию и продукции дифференцированных клеток, образующих данную ткань [6, 10, 20].

Основные вехи истории изучения СК можно представить следующим образом.

1988 г. – СК были впервые использованы для трансплантации.

1992 г. – получена первая именная коллекция СК. Профессор Дэвид Харрис заморозил СК пуповинной крови своего первенца. Сегодня Дэвид Харрис – директор крупнейшего в мире банка стволовых клеток пуповинной крови.

1996 г. – за период с 1996 по 2004 г. были выполнены 392 трансплантации аутологичных СК.

1997 г. – в 45 медицинских центрах мира проведено 143 трансплантации пуповинной крови. В России проведена первая операция онкологическому больному по пересадке СК из пуповинной крови младенцев.

1998 г. – первая в мире трансплантация СК пуповинной крови девочке с диагностированной нейробластомой. Общее число проведенных трансплантаций пуповинной крови превышает 600. В этом же году американскими учеными Д. Томсоном и Д. Беккером удалось выделить человеческие эмбриональные СК и получить их первые линии. Ученые нашли способ выращивать стволовые клетки в искусственной питательной среде.

1999 г. – журнал «Science» признал открытие эмбриональных СК (ЭСК) третьим по значимости событием в биологии после расшифровки двойной спирали дезоксирибонуклеиновой кислоты и программы «Геном человека».

2000 г. – в мире проведено 1200 трансплантаций СК пуповинной крови, из них двести родственных.

2001 г. – опубликованы первые официальные данные о возможности применения трансплантации СК пуповинной крови у взрослых пациентов, из них более 90% с хорошим результатом. В этом же году показана способность взрослых гемопоэтических и СК костного мозга человека дифференцироваться в кардиомиоциты и гладкомышечные клетки, эта способность используется в регенеративной кардиологии.

2003 г. – журнал Национальной академии наук Соединенных Штатов Америки «Proceedings of the National academy of science USA» опубликовал сообщение о том, что через 15 лет хранения в жидком азоте СК пуповинной крови полностью сохраняют свои биологические свойства. Мировая коллекция СК, хранящихся в банках, достигла 72000 образцов. В мире произведено уже 2592 трансплантаций СК пуповинной крови, из них 1012 – взрослым пациентам.

2004 г. – общая мировая коллекция СК пуповинной крови приближается к 400000 образцов. В мире произведено около 5000 трансплантаций пуповинной крови. Для сравнения – число трансплантаций костного мозга за тот же период составило около 85000.

2005 г. – перечень заболеваний, при лечении которых может быть успешно применена трансплантация СК, достигает нескольких десятков. Основное внимание уделяется лечению злокачественных новообразований, различных форм лейкозов и других болезней крови. Разработаны международные протоколы лечения рассеянного склероза. Проводятся многоцентровые исследования при лечении инфаркта миокарда и сердечной недостаточности. Ищутся подходы к лечению инсульта, болезни Паркинсона и Альцгеймера. В основе многих патологий лежат количественные изменения СК. Так, соотношение СК и других клеток организма с возрастом изменяется следующим образом: у новорожденного – 1:10000, у подростков – 1:100000, у взрослого – 1:1000000, у пожилого – 1:10000000.

2008 г. – Роберт Ланза и его коллеги из Advanced Cell Technology и Калифорнийского университета в Сан-Франциско вывели первые ЭСК человека без разрушения эмбриона; посредством терапевтического клонирования культивированы клонированные бластоцисты человека. Плюрипотентные СК выведены из печени и желудка мыши. Впервые опубликовано исследование врачей из Института регенеративной медицины (Regenerative Sciences Institute), посвященное успешной регенерации хряща в коленном суставе человека при использовании аутологичных зрелых мезенхимальных СК. Забине Конрад с коллегами (Германия) вывели плюрипотентные СК из сперматогоний зрелого яичка человека.

2009 г. – Ким Гвансу с коллегами из Гарварда разработали способ манипулирования клетками кожи для выведения индуцированных плюрипотентных СК с учетом индивидуальной специфики пациента. Андреаш Надь, Кэйсукэ Кадзи и их коллеги открыли способ выведения ЭСК из обычных зрелых клеток.

2011 г. – израильский учёный Инбар Фридрих Бен-Нун с группой учёных получили первые СК вымирающих видов животных.

2012 г. – введение пациентам СК, взятых из их собственного костного мозга через три или семь дней после инфаркта миокарда, показало неэффективность этой методики, но немецкими специалистами были получены положительные результаты в лечении другой сердечной патологии.

2013–2018 гг. – совершенствуются методики по выделению стволовых клеток из пуповинной, периферической крови и костного мозга [7, 11, 14, 16, 27].

В настоящее время исследования как ЭСК, так и СК взрослого организма ведутся чрезвычайно активно. Удалось получить из СК нейроны, кожную и хрящевую ткань, вырастить сосуды, кость. Однако остается неизвестным, каким образом работает этот клеточный банк, при каких условиях возможна реализация заложенных биологических эффектов, каким путем достигается безошибочное копирование органов. Основная задача следующих лет – расшифровка плана строения организма, упакованного в одну клетку [8, 14, 17].

Существует несколько классификаций СК. Так, по способности к *дифференциации* выделяют: 1) тотипотентные клетки, которые способны формировать все эмбриональные и экстраэмбриональные типы клеток. К ним относятся только оплодотворенный ооцит и бластомеры 2–8 клеточной стадии; 2) плюрипотентные клетки способны формировать все типы клеток эмбриона. К ним относятся ЭСК, первичные половые клетки и клетки эмбриональных карцином; 3) мультипотентные клетки способны образовывать клетки многих, но не всех типов; 4) унипотентные клетки способны дифференцироваться только в один тип клеток. Мультипотентные и унипотентные СК локализируются в сформировавшихся тканях взрослого организма [23, 27].

По *источнику выделения* СК бывают: 1) ЭСК – внутриклеточная масса раннего эмбриона (на этапе бластоцисты 4–7 день развития); 2) фетальные СК (ФСК) – клетки зародыша на 9–12 неделе развития, выделенные из абортивного материала; 3) СК взрослого организма – гемопоэтические СК (ГСК) – мультипотентные СК, дающие начало всем клеткам крови: эритроцитам, В- и Т-лимфоцитам, нейтрофилам, базофилам, эозинофилам, моноцитам, макрофагам и тромбоцитам. Кроме костного мозга, ГСК обнаружены в системном кровотоке и скелетных мышцах. Клетки, из которых образуются клетки крови, имеют на своей поверхности маркеры – кластеры дифференциации (cluster of differentiation – CD34, CD59) [7, 15, 24].

У новорожденных, взрослых и пожилых людей ГСК сосредоточены в красном костном мозге, который расположен внутри тазовых костей, ребер, эпифизов длинных трубчатых костей и тел позвонков. Однако у плода источником ГСК становится мезодерма желточного мешка, после чего кроветворная функция переходит к печени и селезенке. Лишь через два месяца начинается окостенение с образованием костного мозга (с первоначальной локализацией в ключице). Также после формирования клеток иммунной системы (ИС) происходит их миграция в центральные органы ИС [6, 12].

Таким образом, СК красного костного мозга делают его как органом гемопоэза, так и иммунопоэза. Это важно в связи с тем, что клетки крови требуют регулярного обновления. Так, продолжительность жизни клеток крови составляет: эритроцитов – 120 дней; лейкоцитов – 5 дней; тромбоцитов – 6–7 дней. За воспроизводство эритроцитов отвечают СК миелоидного ряда, которые принято считать мультипотентными. Регулирование их деятельности, как и других СК костного мозга, осуществляется благодаря синтезу цитокинов. Как правило, по мере дифференцировки значительно снижаются потенциальные возможности клеток [9, 16, 26].

Если по тем или иным причинам поражается костный мозг, содержащий СК, эритроциты и другие клетки крови некоторое время остаются на нормальном уровне за счет депо (как правило, не все клетки крови одновременно циркулируют в кровотоке).

Однако после истощения пула зрелых клеток происходит резкое снижение необходимых для жизнедеятельности организма эритроцитов, тромбоцитов и клеток ИС. Это проявляется системной гипоксией, рецидивирующими кровотечениями и выраженным иммунодефицитом, который нередко становится причиной летального исхода [25, 27].

Мезенхимные СК – мультипотентные региональные СК, содержащиеся во всех мезенхимальных тканях (главным образом в костном мозге), способные к дифференцировке в различные типы мезенхимальных тканей, а также в клетки других зародышевых слоев. Они способны осуществлять трофическую поддержку, модулировать иммунный ответ. Их фенотип – CD34, CD105, CD90, CD29, Sca-1, Thy-1, рецептор костных морфогенетических белков (Bone morphogenetic protein receptor – BMPR), SH3, SH4. Образуемые ими типы клеток – хондроциты, остециты, адипоциты, кардиомиоциты, скелетные мышечные волокна. СК кожи, размещенные в базальных пластах эпидермиса и возле основы волосяных фолликулов, могут давать начало кератоцитам, которые мигрируют на поверхность кожи и формируют защитный слой кожи. СК скелетной мускулатуры выделяют из поперечнополосатой мускулатуры, они способны к дифференцировке в клетки нервной, хрящевой, жировой и костной тканей, поперечнополосатой мускулатуры. Однако последние исследования показывают, что клетки скелетной мускулатуры, это не что иное, как мезенхимальные СК, локализованные в мышечной ткани. Их фенотип – М-кадгерин, Pax7, нервная молекула межклеточной адгезии (Neural cell adhesion molecule – NCAM), рецептор фактора роста гепатоцитов (c-Met). СК миокарда способны дифференцироваться в кардиомиоциты и эндотелий сосудов. СК жировой ткани обнаружены в 2001 г., они могут превращаться и в другие типы тканей. Из них можно выращивать клетки нервов, мышц, костей, кровеносных сосудов. СК спинного мозга (мезенхимальные СК) дают начало разным типам клеток: костным клеткам (остеоцитам), хрящевым клеткам (хондроцитам), жировым клеткам (адипоцитам), а также другим типам клеток соединительной ткани [21, 25].

Тканеспецифичные СК располагаются в различных видах тканей и в первую очередь отвечают за обновление их клеточной популяции, первыми активируются при повреждении. Обладают более низким потенциалом, чем стромальные клетки костного мозга. Главная их роль в организме – замена старых клеток. К тканеспецифическим СК организма относят эпителиальные, гемопоэтические, мезенхимальные, эндотелиальные, нервные, обонятельные и тестикулярные клетки, а также клетки молочных желез и желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [2, 13].

Эпителиальные СК пищеварительного тракта расположены в глубоких складках оболочек кишечника и могут давать начало разным типам клеток пищеварительного тракта. СК тканей пищеварительной системы непрерывно делятся на протяжении всей

жизни человека и обеспечивают обновление эпителия, выстилающего ЖКТ. Как правило, считается, что именно эти клетки являются источником большинства видов рака тонкого и толстого кишечника.

Эндотелиальные СК локализируются в эндотелии сосудов, обеспечивая их выстилку. Они относятся к одним из трех типов мультипотентных клеток костного мозга. Образуемые ими типы клеток – эндотелиальные клетки, кардиомиоциты, их фенотип – CD34, GATA2 (относится к семейству, включающему в себя 6 транскрипционных факторов (GATA 1–6), содержащих общий ДНК фрагмент (A/G) GATA(A/G) и концевой цинксодержащий домен). Установлено, что GATA-белки можно разделить на гемопоэтические (GATA-1, GATA-2, GATA-3) и негемопоэтические (GATA-4, GATA-5, GATA-6). Так, дефекты GATA-1 выявлялись при острой мегакариоцитарной лейкемии. Vascular endothelial growth factor (VEGF) или Flk-1 является основным рецептором, опосредующим передачу сигнала от лиганда VEGF как в эндотелиальных клетках, так и в клетках других типов. Функционирование рецептора VEGFR на протяжении эмбриогенеза является критическим для развития организмов. Нокаут гена *Flk1*, кодирующего белок-рецептор VEGFR, приводит к гибели эмбрионов мышей в период между 8,5–9,5 днями. Причиной гибели эмбрионов является образование в зародыше недостаточного количества гемопоэтических и эндотелиальных клеток-предшественников [18, 22, 26].

Нервные СК локализируются в тканях центральной и периферической нервных систем. Эти клетки имеют много общего с гемопоэтическими СК. Кроме того, при экспериментальном введении нервных СК в периферическую кровь они нередко дифференцируются в различные типы клеток ИС. Нейрональные СК головного мозга дают начало трем основным типам клеток: нервным клеткам (нейронам) и двум группам не нейрональных клеток – астроцитам и олигодендроцитам. Известны молекулярные маркеры, позволяющие идентифицировать их как стволовые нервные клетки, а также последовательные фазы их развития. Это CD133, нестин для СК, виментин для клетки-предшественника, бета-тубулин для нейробласта, GFAP (кислый глиальный фибриллярный белок) для клетки, «движущейся» в направлении глиального развития. Установлено, что нервные СК характеризуются вырванным консерватизмом.

Обонятельные СК локализируются в слизистой носа (в верхних отделах) и принимают участие в рецепции запахов. Важность их отдельного выделения связана с тем, что при помещении обонятельных СК в определенные условия их физиологические особенности приближаются к ЭСК. Доказано, что потенциал тесткулярных СК к дифференцировке при соблюдении определенных условий может соотноситься с ЭСК. Стромальные СК – мультипотентные СК взрослого организма, образующие строму костного мозга (поддерживающую гемопоэз), имеющие мезенхимальное происхождение [19, 21, 24].

СК размножаются, как и все остальные клетки, путем деления. Их отличие состоит в том, что они могут делиться неограниченно, а зрелые клетки обычно имеют ограниченное количество циклов деления. Созревание СК проходит несколько стадий. В результате в организме имеется ряд популяций СК различной степени зрелости. Чем более зрелой является клетка, тем меньше вероятность превращения ее в клетку другого типа. ДНК во всех клетках одного организма (кроме половых), в том числе и стволовых, одинакова. Геном у всех клеток идентичен, но режим работы, в котором он находится, различен. Дифференцировку СК могут запускать как внутренние причины, так и внешние. Любая клетка реагирует на внешние раздражители, в том числе и на специальные сигналы цитокинов, приводящие к регулированию экспрессии генов [23, 25].

Для простоты восприятия чаще всего выделяют два типа СК. Первые – ЭСК, из которых состоит эмбрион. Вторые называются взрослыми, или соматическими, СК. Их фенотип – CD34, CD31, CD59, Sca-1, Thy1, Octamer-4 (Oct-4 – это транскрипционный фактор, участвует в самообновлении недифференцированных эмбриональных стволовых клеток), Nanog (транскрипционный фактор, маркер самообновления), SOX2 (фактор транскрипции, необходим для поддержания плюрипотентности), fibroblast growth factor receptors (FGF4). Образуемые типы клеток – эритроциты, лейкоциты (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, лимфоциты, моноциты), тромбоциты. Считается, что это остатки эмбриональных СК, находящихся в тканях недифференцированными. СК – это неспециализированные клетки, способные делиться в течение долгого времени. Причем в результате каждого деления образуются две идентичные клетки. Клетки однодневного эмбриона способны дифференцироваться в любой из около 220 типов клеток, образующих человеческое тело [7, 24].

ЭСК могут дифференцироваться в три различных типа тканей: эндодерму, дающую начало внутренним органам, мезодерму, из которой развиваются соединительная, мышечная и костная ткани, а также формируется система кровообращения, и эктодерму производную кожи, органов чувств и нервных клеток. Из-за способности дифференцироваться в различные типы тканей ЭСК называют мультипотентными. Классическими маркерами ЭСК являются изозимы щелочной фосфатазы, транскрипционный фактор Oct-4, высокая теломеразная активность и ряд маркеров клеточной поверхности. Например, GCM-2, TRA-1-60, SSEA-3 и SSEA-4, распознаваемые моноклональными антителами к специфическим эмбриональным или опухоль-определяющим антигенам. Физиологическое значение большинства маркеров остается неясным, за исключением Oct-4. Исследования, проведенные на ЭСК и эмбрионах мыши, выявили критическую роль Oct-4 в поддержании тотипотентности ранних эмбриональных клеток и клеток зародышевого пути. Дифференцировка клеток внутренней массы сопро-

вождается понижением уровня Oct-4, а изменение уровня синтеза Oct-4 в ЭСК в свою очередь приводит к потере тотипотентности и переходу к дифференцировке. Кроме Oct-4, имеется еще ряд транскрипционных факторов, синтезируемых в основном недифференцированными ЭСК. Например, Nanog, который занимает важное место в иерархии факторов, определяющих недифференцированную природу ЭСК и их происхождение [27].

Соматические клетки также способны к дифференциации, однако более ограниченной, чем эмбриональные. Соматические клетки одного типа способны давать начало другим типам клеток. Это свойство делает возможным применение соматических стволовых клеток для терапии и репарации больных и поврежденных тканей. Использование соматических СК ограничивает то, что они труднее поддаются дифференциации и культивируются в лабораторных условиях хуже, чем эмбриональные [17, 21].

Одним из основных источников получения СК в настоящее время являются эмбриональные ткани. Отличительными особенностями ЭСК являются их способность к бесконечной пролиферации симметричным делением в лабораторной культуре и выраженная клоногенность. В то же время огромный интерес представляют установленные свойства пластичности СКК и соматических СК. Они дифференцируются в ограниченное число клеточных типов, то есть имеют потенциал мульти- или унипотентного созревания и не обладают плюрипотентностью – способностью давать начало всем клеточным типам, образующимся из трех зародышевых листков [22, 26].

Таким образом, представленные проблемы и перспективы использования клеточных технологий во многих областях медицины (трансплантация органов, испытание лекарственных препаратов, лечение и восстановление поврежденных тканей и т. д.) могут быть эффективно применены на практике после решения следующих задач. СК должны быть доступны в необходимых количествах. Дифференциация СК должна быть строго направленной и специфичной. СК должны быть жизнеспособны в организме реципиента. После трансплантации СК должны быть способны интегрироваться в ткани реципиента. Трансплантант должен функционировать в течение всей жизни реципиента. Трансплантация не должна наносить какого-либо вреда реципиенту (включая иммунную реакцию отторжения) [7, 18, 23].

В последние десятилетия были разработаны различные способы выделения и обогащения кровяных СК из периферической крови, костного мозга и пуповинной крови новорожденных, являющейся наиболее перспективным источником получения кровяных СК. Кровь из пуповины, несколько десятков миллилитров которой выливается при рождении ребенка, содержит немало СК, в основном кровяных «предшественников» – гемопоэтических прогениторных клеток (ГПК). Общая концентрация ГПК в пуповинной крови ниже, но число ранних кле-

ток-предшественников значительно выше, чем в костном мозге (в пуповинной крови содержится в 2 раза больше полипотентных ГПК, чем в таком же объеме трансплантата костного мозга). Но главное – пуповинную кровь не надо специально забирать с помощью особого оборудования. Достаточно вовремя собрать ее после родов в стерильный пластиковый контейнер, затем провести анализ ее образца, заморозить с помощью жидкого азота и поместить на хранение. За 1 раз может быть забрано в среднем около 80–100 мл пуповинной крови. В среднем для трансплантации достаточно 1 мл пуповинной крови на 1 кг массы тела реципиента [24, 27].

Использование пуповинной крови имеет ряд преимуществ перед использованием костного мозга. Пуповинная кровь не используется с другими целями и в большинстве случаев выбрасывается вместе с плацентой и пуповиной. Использование пуповинной крови не причиняет донору никакого вреда, и эту кровь легко собирать. Кривообработанную пуповинную кровь можно использовать сразу после типирования лейкоцитарных антигенов человека (Human leucocyte antigens HLA). Вероятность контаминирования инфекционными агентами не является высокой. Возможность выполнения иммунологических перекрестных проб с реципиентом дает преимущество использованию кривообработанной пуповинной крови перед трансплантацией костного мозга [18, 23].

Рассмотренные варианты получения СК показывают, что на данный момент реальными источниками СКК у человека для практического применения являются костный мозг и периферическая кровь. Потенциальными источниками клеток, обладающих способностями восстанавливать кроветворение, являются стволовые элементы мышечной ткани (сателлитные клетки), эпителия кишечника и др. И все же наиболее перспективным источником СКК, несомненно, следует считать клетки внутренней массы бластоциста, или ЭСК. ЭСК являются онтогенетическими предшественниками СКК, так как именно из них происходят клетки и ткани трех зародышевых листков, в частности СКК мезенхимального происхождения [15, 17].

Представляется естественным, что число клеток с характеристиками ЭСК *in situ* в бластоцисте отдельных индивидов не зависит ни от вида животных, ни от генотипа человека. Оно всегда является постоянным, как и их пролиферативная активность. В то же время количество СКК в костном мозге, процент последних в S-фазе клеточного цикла находятся под влиянием генотипа, как и связанное с этими характеристиками СКК старение самого организма. Недифференцированные ЭСК резистентны к действию такого мощного ингибирующего фактора, как трансформирующий ростовой фактор – (ТРФβ). ТРФβ при отсутствии в культуральной среде фактора LIF (фактор, ингибирующий лейкомию), поддерживающего рост ЭСК, индуцирует их дифференцировку в эндотелиальные клетки. Видимо, в этот момент и появляются рецепторы к этому фактору на поверхности ЭСК. В то же время ТРФβ оказывает до-

статочное выраженное антипролиферативное действие на СКК. В целом появление в онтогенезе обеих популяций стволовых клеток рецепторов к ТГФβ – молекул CD105 (эндоглин) – свидетельствует о готовности к дифференцировке обеих клеточных популяций [9, 16, 19].

Одним из самых ярко выраженных признаков способности клетки к пролонгированной пролиферативной активности является величина клеточной теломеры, непосредственно связанной с активностью теломеразы. Чем активнее последняя и длиннее первая, тем к более длительной пролиферативной активности и к более длительному самоподдержанию способна данная клетка. ЭСК составляют внутреннюю массу бластоциста и делятся ограниченное число раз. Однако при сравнении со СКК обнаружилось следующее. Размеры теломер и активность теломеразы в СКК на разных стадиях онтогенеза постепенно снижаются с более высокой в клетках из эмбриональной печени, затем в клетках из крови пуповины, из периферической крови взрослого человека и, наконец, из костного мозга, где величина теломеры в СКК была самой низкой. При этом было показано, что низкий уровень теломеразной активности в CD34⁺CD38⁻ СКК из костного мозга возрастал при стимуляции их пролиферативной активности с помощью коктейля из ряда цитокинов (фактора роста стволовых клеток (stem cell factor – SCF), интерлейкинов (IL) 3, IL-6, эритропоэтина (Epo), гранулоцитарных колониестимулирующих факторов (G-CSF)), но не отдельных из них. Данный факт свидетельствует о более эффективном применении коктейля цитокинов, чем одного из них, при ряде заболеваний и в процессе старения, связанных с укорочением теломеры. Однако, несмотря на повышение активности теломеразы, величина теломеры в СКК постепенно снижалась в процессе их экспансивного деления. По-видимому, теломераза хоть и уменьшает выраженность укорочения длины теломеры в ходе усиленной пролиферативной активности, но полностью компенсировать процесс уменьшения размера теломеры она не может. По сравнению со СКК из костного мозга, ЭСК характеризуются более высокой активностью теломеразы, большими размерами теломеры, что и позволяет их пассировать в течение более одного года в культуре *in vitro* с удвоением размера популяции более чем в 300 раз без изменения кариотипа. Возможно, одной из важнейших причин большей активности теломеразы в ЭСК, чем в СКК, является нахождение первых в условиях относительной гипоксии по сравнению со вторыми. Показано, что гипоксия является мощным фактором стимуляции активности теломеразы в мышечных клетках. В плане межвидовых различий представляется интересным тот факт, что в культуральных условиях при образовании колоний ЭСК человека делятся в 3 раза медленнее ЭСК мышей (36 и 12 ч соответственно). Возможно, это и является тем онтогенетически первоначальным вкладом в различие продолжительности жизни между человеком и животными [11, 13, 16, 23].

Относительно взаимоотношений между ЭСК и СКК прежде всего ясно одно, что так или иначе первые являются предшественниками вторых. И если *in situ* в раннем онтогенезе механизмы этих взаимоотношений остаются невыясненными, то в культуре клеток ЭСК мышей *in vitro* показана возможность их прямой дифференцировки в СКК в присутствии клеток фидерного слоя из стромальных клеток и некоторых цитокинов. Определен даже день, с момента которого ЭСК начинают дифференцироваться в СКК. Оказалось, что уже на 4-й день после начала культивирования *in vitro* ЭСК мышей при определенных условиях в отсутствие фидерного слоя регистрировали СКК. Интересен тот факт, что маркеры эритроидной дифференцировки (глобин) появлялись раньше (на 5-е сутки после начала культивирования ЭСК), чем маркеры лимфоидной дифференцировки CD2, CD5, RAG-1 (на 6–8-е сутки). Последнее подтверждает многочисленные наблюдения о первостепенной, эволюционно обусловленной возможности СКК дифференцироваться в эритроидном направлении по сравнению с другими кроветворными ростками. Предполагается, что ген фактора транскрипции *HoxB4* является одним из генов, способствующих дифференцировке ЭСК в СКК [10, 12, 14, 16, 19, 23].

Известно, что клетки различных тканей различаются между собой не только по функциональным специфическим свойствам, но и по вне- и внутриклеточным маркерам. Каждая стадия дифференцировки ЭСК и СКК характеризуется специфическими для нее маркерами. Одним из основных маркеров для недифференцированных делящихся ЭСК является фактор транскрипции Oct4. Мишенью действия данного фактора транскрипции в ЭСК является ген *Fgf4*, кодирующий FGF-4. Кроме того, такие маркеры, как SSEA-3, SSEA-4 (стадиоспецифические эмбриональные антигены), TRA-1-60 (гликопротеины высокой молекулярной массы), TRA-1-81 (кислая фосфатаза) и нуклеостимин, также являются характерными для ЭСК. Нуклеостимин участвует в контроле прогрессии клеточного цикла, экспрессируется и в СКК. Признанным маркером для СКК является молекула CD34, хотя ее экспрессия также определяется практически на всех коммитированных предшественниках, но не регистрируется на ЭСК. Обладая адгезивными свойствами, CD34 характеризует способность СКК дифференцироваться в направлении кроветворных клеток. При этом, если в процессе дифференцировки ЭСК в примитивные СКК у мышей для экспрессии CD34 не требуется активности гена *c-Myb*, то для последующей функциональной дифференцировки самих СКК необходимо присутствие в клетке активного гена *c-Myb*. В то же время показано, что часть примитивных СКК не экспрессируют CD34-молекулу. Возможно, это является отражением стадии непосредственной дифференцировки последних из ЭСК. В настоящее время для СКК определен и маркер CD133, характеризующий более примитивные стадии онтогенеза СКК. Интересно, что хотя Oct4 на ЭСК и связан с поддержанием популяции этих клеток в не-

дифференцированном состоянии, при увеличении его экспрессии ЭСК могут начать дифференцироваться в направлении клеток примитивных эндо- и мезодермы. По-видимому, аналогичная ситуация складывается и в отношении CD34-антигена на СКК, увеличение экспрессии которого связано, очевидно, с готовностью этих клеток дифференцироваться в коммитированные прекурсоры [8, 9, 15, 16, 19, 23, 26].

LIF является одним из самых необходимых для поддержания роста, по крайней мере, ЭСК мышей, в культуральных условиях без фидерного слоя. Показано, что и LIF, и рецептор к нему экспрессируются в бластоцистах у мышей. У человека в бластоцистах определяется только рецептор к этому фактору, хотя ЭСК человека не отвечают на действия фактора в отсутствие фидерного слоя. Можно думать, что различные фидерные слои клеток продуцируют некие факторы, способствующие пролиферации ЭСК человека. Одним из них может быть фактор роста фибробластов, добавление которого в культуру ЭСК человека ингибирует тенденцию их к дифференцировке, способствуя эффективности клонирования. В свою очередь основным ростовым фактором для СКК является, очевидно, фактор роста стволовых клеток (SCF) [9, 14, 25].

ЭСК могут дифференцироваться в клетки практически всех тканей организма. СКК дифференцируются в кроветворные клетки либо через дедифференцировку в более примитивные (возможно, в ЭСК), либо через трансдифференцировку, являющуюся выражением процесса пластичности, в клетки других тканей. Однако есть данные о третьей возможности появления печеночной клетки из СКК вследствие клеточного слияния. Процесс клеточного слияния описан также и для ЭСК. Налицо одна из общих физиологических характеристик двух стволовых клеточных популяций. В то же время для клеток островков Лангерганса вариант слияния не обнаружен и показана возможность реализации только варианта трансдифференцировки. Выбор пути СКК может зависеть от вида повреждения (радиация, химическое воздействие и др.) и связанного с этим эффектом микроокружения [17, 19, 27].

Провоспалительные цитокины могут быть индукторами слияния тех же эндогенных СКК в участке воспаления с местными клетками поврежденного органа. Сам по себе процесс трансдифференцировки, по-видимому, не является прерогативой тех же СКК, так как, например, описана возможность трансдифференцировки CD19⁺B220⁺-В-клеток и про-Т-клеток в макрофаги. Все, очевидно, зависит от микроокружения. Следовательно, если даже и показана возможность у обеих популяций стволовых элементов быть предшественниками многих клеточных элементов, пути реализации этих возможностей, скорее всего, различны. В одном случае это дифференцировка, процесс, характерный для ЭСК, в другом – трансдифференцировка и, возможно, дедифференцировка для СКК. Последние два пути и могут лежать в основе каких-то еще неизвестных базовых отличий между ЭСК и СКК. Однако справедливо предположение и о близких свойствах

между ними. Например, когда способность СКК дифференцироваться в некроветворные клетки подавлена гемопоетическим микроокружением, а вне его СКК могут реализовывать эту способность. Перечисленные факторы ЭСК и СКК свидетельствуют о близких механизмах функционирования данных клеточных популяций [7, 23, 27].

Интересно, что СКК, произошедшие из ЭСК при культивировании последних в условиях *in vitro*, обладают ограниченной способностью восстанавливать гемопоез у мышей-реципиентов. В отдельных экспериментах восстановление ограничивалось только лимфопоезом. Видимо, это отражает какие-то фундаментальные различия между СКК взрослого организма и СКК, произошедшими непосредственно из ЭСК. Возможно, последние еще не приспособлены к микроокружению кроветворных органов взрослого организма или они должны пройти некие стадии дифференцировки до того, чтобы выполнить свои физиологические функции. Отмечено также и недостаточно эффективное приживление СКК из зрелого организма при трансплантации их старым животным. В то же время показано, что повышение экспрессии из ЭСК в СКК отдельных онкогенов и факторов транскрипции (зона ложного точкового кластера (break-point cluster region – Bcr), HoxB4-нуклеарный фактор, STAT5-signal transducer and activator of transcription) способствует дифференцировке ЭСК в полноценные СКК. Следовательно, сниженная выработка продуктов названных выше генов в ЭСК может быть одним из механизмов неэффективной их дифференцировки в СКК в культуральных условиях. Не исключено, что для полноценной дифференцировки ЭСК в СКК необходимо комплексное воздействие ряда индуцирующих факторов, в частности коктейля из цитокинов, особое место в котором принадлежит цитокинам, продуцированным стромальными клетками [22, 25].

ЭСК присуща выраженная пластичность, т. е. способность дифференцироваться в различных направлениях, не соответствующих их тканевому месторасположению. Не исключено, что некоторые ЭСК, составляющие внутреннюю массу бластоциста, освобождены от необходимости дифференцировки в примитивные зародышевые ткани и по мере созревания органов и тканей заселяют последние, становясь теми самыми стволовыми элементами, которые и определяют во взрослом организме. При этом они теряют часть структурно-функциональных характеристик, приобретают новые, а некоторые сохраняют в неизменном виде. Например, оказалось, что фактор транскрипции Pitx2 (paired-like homeodomain transcription factor 2) экспрессируется как в ЭСК, так и в СКК. Общими оказались и такие клеточные маркеры, как CD90 (thy-1), CD133, CD117 (c-kit). Также в обеих популяциях СК была обнаружена экспрессия таких генов факторов транскрипции, как *KaKtal-1*, *GATA-2*, *c-Myc*. Оказалось, что в обеих популяциях СК за длительное сохранение способности к самоподдержанию без ухода в дифференцировку отвечает путь через акти-

вазию фактора транскрипции Wnt, с которым связана активность таких основополагающих факторов транскрипции, как Oxt3/4 и Rex-1 в ЭСК, HoxB4 и Notch-1 в СКК. Последние данные дают возможность предположить наличие какой-то переходной субпопуляции стволовых элементов между ЭСК и СКК [19, 24, 27].

Установлен ряд генов, ответственных за гемопозитическую дифференцировку ЭСК. К последним, очевидно, следует отнести ген фактора транскрипции SCL, так как в его отсутствие у мышей нарушается гемопозез, но остается интактным процесс образования эндотелиальных клеток. И это осуществляется несмотря на происхождение гемопозитических и эндотелиальных клеток из общего предшественника – гемангиобласта [13, 18].

Ряд различий, имеющих место между ЭСК и СКК, скорее всего, может свидетельствовать об изменениях, необходимых для процесса адаптации клеток к меняющимся условиям микроокружения. Так, например, показано, что протеин-4 костного морфогенеза является необходимым фактором усиления дифференцировки ЭСК обезьян в СКК. Не исключено, что и во взрослом организме существуют субпопуляции СК, для которых этот фактор также будет выполнять роль регулятора дифференцировки, хотя он и не оказывает влияния на зрелые СКК [11, 13].

Можно предположить, что какая-то часть ЭСК, являясь составной частью внутренней массы бластоциста, не дифференцируется в клетки разных тканей в процессе онтогенетического развития, а формирует популяцию стволовых элементов, имеющих определенные, специфические особенности в зависимости от своего месторасположения в данной конкретной ткани организма, сохраняя при этом способность дифференцироваться не только в клетки этой ткани, но и в клетки других тканей. Естественно, при этом будут изменяться клеточные маркеры и другие морфофункциональные характеристики соответственно тканевому местонахождению, но останется главное – их способность к дифференцировке в зрелые клетки той ткани, которая является их «онтогенетическим местожительством». В костном мозге здоровых доноров были обнаружены стволовые клетки, фенотипически (CD34, CD44^{low}, CD45, CDH7(cKit), HLA-I класса и HLA-DR) отличные от СКК и мезенхимальных стволовых клеток. Они были обозначены как мезодермальные клетки-предшественники (МКП). По-видимому, МКП могут, как и ЭСК, дифференцироваться не только в клетки мезодермального типа, но и в клетки нейроэктодермального типа. Возможно, что МКП являются фенотипически (а это значит и функционально) измененными ЭСК, в онтогенезе вертикально «попавшими» в костный мозг из бластоциста. Вполне вероятно, что во взрослом организме, скорее всего, в том же костном мозге можно найти экто- и эндодермальные клетки-предшественники с определенными отличиями и сходством между собой и с МКП [21, 23, 25].

К сожалению, достоверный механизм (или механизмы) дифференцировки ЭСК в СКК остается невы-

ясненным. Несомненно, что, изучая экспрессию генов рецепторов к факторам роста, экспрессию факторов транскрипции и реализующих передачу сигналов ауто- и паракринно действующих регуляторных молекул, можно постепенно приблизиться к пониманию данных механизмов. Однако это более вероятно в условиях *in vitro*, а в условиях *in vivo* эти механизмы могут весьма существенно отличаться. Кроме того, неясно, что означает этот процесс дифференцировки, в ходе которого обычно любая клетка что-то теряет, а что-то приобретает. Если говорить о СКК, то в процессе дифференцировки в коммитированные предшественники она теряет способность к неограниченной пролиферации, к трансдифференцировке, но приобретает способность к производству каких-либо зрелых клеток.

В целом открытие СК и развитие клеточных технологий в медицине наряду с расшифровкой двойной спирали ДНК и генома, безусловно, относятся к важнейшим событиям, произошедшим в биологии в XX в.

СК таят в себе невиданные возможности: от регенерации поврежденных органов и тканей до лечения заболеваний, не поддающихся лекарственной терапии. Кроме восстановления утраченных функций органов и тканей, СК способны тормозить неконтролируемые патологические процессы, такие как воспаление, аллергические реакции, онкологические процессы, старение и т. д.

Именно клеточные технологии являются основой генной терапии, с которой связаны надежды на разработку индивидуальных схем лечения пациентов, страдающих самыми тяжелыми заболеваниями, в том числе наследственными. Клеточные технологии и генная терапия представляют собой наиболее универсальные современные подходы к лечению. Технология СК может привести к новому пониманию развития и дифференциации клеток, а также к пониманию того, как и почему развиваются определенные ткани, почему возникают заболевания и как их лечить. Станет возможным клонирование от отдельных тканей до целых организмов.

Таким образом, клеточная биология наглядно демонстрирует реальное значение в решении актуальных проблем медицины XXI в.

Литература

1. Владимирская, Е.Б. Биологические основы и перспективы терапии стволовыми клетками / Е.Б. Владимирская, О.А. Майорова, С.А. Румянцев. – М.: Медицина и здоровье, 2007. – 392 с.
2. Москалев, А.В. Общая иммунология с основами клинической иммунологии / А.В. Москалев, В.Б. Сбойчаков, А.С. Рудой. – М.: Гэотар-Медиа, 2015. – 351 с.
3. Москалев, А.В. Аутоиммунные заболевания. Диагностика и лечение / А.В. Москалев [и др.]. – М.: Гэотар-Медиа, 2017. – 218 с.
4. Трактуев, Д.О. Стромальные клетки жировой ткани – пластический тип клеток, обладающих высоким терапевтическим потенциалом / Д.О. Трактуев, Е.В. Парфенова, В.Н. Ткачук // Цитология. – 2006. – Т. 48. – С. 83–94
5. Трактуев, Д.О. Стромальные клетки жировой ткани – мультипотентные клетки с терапевтическим потенциалом для стимуляции ангиогенеза при ишемии тканей / Д.О. Трактуев [и др.] // Кардиология. – 2006. – Т. 6. – С. 53–63

6. Ярилин, А.А. Иммунология / А.А. Ярилин. – М.: Гэотар-Медиа, 2010. – 957 с.
7. Abbas, A.K. Cellular and Molecular Immunology. – 9th edition / A.K. Abbas, A.H. Lichtman, S. Pillai. – Philadelphia, Pennsylvania: W. B. Saunders Company, 2018. – 565 p.
8. Cai, L. Suppression of hepatocyte growth factor production impairs the ability of adipose-derived stem cells to promote ischemic tissue revascularization / L. Cai [et al.] // Stem Cells. – 2007. – Vol. 25. – P. 3234–3243
9. Di Rocco, G. Myogenic potential of adipose tissue-derived cells / G. Di Rocco [et al.] // J. Cell Sci. – 2006. – Vol. 119. – P. 2945–2952.
10. Dominici, M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici [et al.] // Cytotherapy. – 2006. – Vol. 8. – P. 315–317.
11. Jeon, E.S. Sphingosylphosphorylcholine induces proliferation of human adipose tissue derived mesenchymal stem cells via activation of JNK / E.S. Jeon [et al.] // J. Lipid Res. – 2006. – Vol. 47. – P. 653–664.
12. Kern, S.E. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue / S.E. Kern [et al.] // Stem Cells. – 2006. – Vol. 24. – P. 1294–1301.
13. Lee, J. Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic conditions / J. Lee [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2006. – Vol. 341. – P. 882–888.
14. Li, B. Adipose tissue stromal cells transplantation in rats of acute myocardial infarction / B. Li [et al.] // Coron Artery Dis. – 2007. – Vol. 18. – P. 221–227.
15. Lipinski, M.J. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials / M.J. Lipinski [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. – 2007. – Vol. 50. – P. 1761–1767.
16. Miyahara, Y. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction / Y. Miyahara [et al.] // Nat Med. – 2006. – Vol. 12, № 4. – P. 459–465.
17. Nakagami, H. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy / H. Nakagami [et al.] // J. Atheroscler. Thromb. – 2006. – Vol. 13. – P. 77–81.
18. Olson, K. Contemporary clinical immunology and serology / K. Olson, E. De Nardin. – New Jersey: Upper Saddle River, 2013. – 439 p.
19. Rose, N.R. The autoimmune diseases. – fifth edition / N.R. Rose, I.R. Mackay. – Philadelphia, 2018. – 1265 p.
20. Schaffler, A. Concise review: Adipose Tissue derived stromal cells – basic and clinical implications for novel cell-based therapies / A. Schaffler, C. Buchler // Stem Cells. – 2007. – Vol. 25. – P. 818–827.
21. Smith, P. Autologous human fat grafting: Effect of harvesting and preparation techniques on adipocyte graft survival / P. Smith [et al.] // Plast. Reconstr. Surg. – 2006. – Vol. 117. – P. 1836–1844.
22. Timper, K. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells / K. Timper [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2006. – Vol. 341. – P. 1135–1140.
23. Traktuev, D.O. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks / D.O. Traktuev [et al.] // Circ. Res. – 2008. – Vol. 102. – P. 77–85.
24. Valina, C. Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion, and remodeling after acute myocardial infarction / C. Valina [et al.] // Eur Heart J. – 2007. – Vol. 28, № 21. – P. 2667–2677.
25. Wu, Y. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis / Y. Wu [et al.] // Stem Cells. – 2007. – Vol. 25. – P. 2648–2659.
26. Yamada, Y. Cardiac progenitor cells in brown adipose tissue repaired damaged myocardium / Y. Yamada [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2006. – Vol. 342. – P. 662–670.
27. Zabriskie, J.B. Essential clinical immunology / J.B. Zabriskie – N. Y., 2009. – 362 p.

A.V. Moskalev, B.Yu. Gumilevskiy, A.V. Apchel, V.N. Tsygan

Stem cells and their physiological effects

Abstract. The characteristic of various populations stem cells is presented. Their physiological features are examined: differentiations, dedifferentiation, transdifferentiation, plasticity, and also the factors promoting their display. The comparative characteristic embryonic and somatic stem cells which are closest to practical application is received broad coverage. It is shown, that embryonic stem cells are differentiated in three various types of tissue: endoderm, giving rise to internal bodies, mesoderm from which develops connecting, muscular and bone tissue, and also the system of blood circulation and ectoderm, a derivative of a skin, sense organs and nervous cells is formed. Because of ability to be differentiated in various types of tissue embryonic stem cells name multipotenteus. Somatic stem cells also are capable to the differentiation however more limited, than embryonic. Somatic cells of one type are capable to give rise to other types of cells. This property makes possible application somatic stem cells for therapy and reparation of the sick and damaged tissues. Use somatic stem cells limits that they give in to differentiation more difficultly and are cultivated in laboratory conditions worse, than embryonic. It is confirmed, that one of the most strongly pronounced attributes of ability of a cell to prolonged proliferative activity is the size cellular telomere, directly connected with activity of enzyme telomerase. The more actively telomerase and is longer telomere, the to longer proliferative activity and to longer self-maintenance the given cell is capable. Advantages, lacks and prospects of various methods of allocation and enrichment hemopoietic stem cells from peripheral blood, a bone brain and umbilical blood of the newborns, being by the most perspective source of reception hemopoietic stem cells are examined and characterized.

Key words: stem cells, marrow, hematosis, peripheral blood, cytokines, transcriptional factors, genes, phenotype, cellular differentiation.

Контактный телефон: 8-921-989-17-42; e-mail: vmeda-nio@mil.ru