

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

Понятие «стволовые клетки» впервые появилось в России еще в начале прошлого века. Тогда великий российский гистолог А.А.Максимов, изучая процесс кроветворения, пришел к выводу об их существовании. Что же это за клетки и каковы их отличительные свойства?

Стволовые клетки могут давать начало любым клеткам организма – и кожным, и нервным, и клеткам крови. Сначала полагали, что во взрослом организме таких клеток нет и существуют они лишь в самом раннем периоде эмбрионального развития. Однако в 70-е годы А.Я.Фриденштейн с соавторами обнаружили стволовые клетки в мезенхиме (строме) «взрослого» костного мозга; в дальнейшем их стали называть стромальными клетками.



Александр Яковлевич Фриденштейн

Тогда же появились работы, доказывающие наличие стволовых клеток практически во всех органах взрослых животных и человека. В связи с этим принято разделять стволовые клетки на эмбриональные стволовые клетки (выделяют из эмбрионов на стадии бластоцисты – очень ранней стадии развития, когда еще нет ни тканей, ни закладок органов) и региональные стволовые клетки (выделяют из органов взрослых особей или из органов эмбрионов более поздних стадий), которые сохраняют свойства эмбриональных

клеток, о чем свидетельствуют обнаруженные в них эмбриональные белковые маркеры.

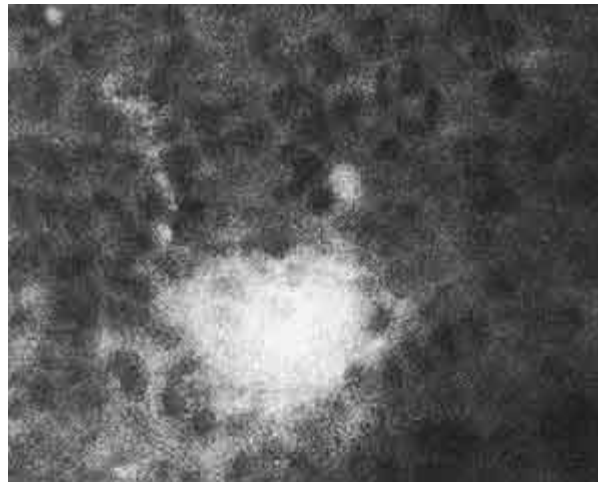


Рис.1. Островки клеток, сохранивших эмбриональные белки (светлые клетки, выявленные с помощью иммунофлюоресцентной техники), в печени взрослой мыши. Препарат получен в 1971 г. в лаборатории Л.И.Корочкина в Новосибирском институте цитологии и генетики СО АН СССР.

Стволовые клетки можно выделять и растить в культуре ткани. При этом образуются шарообразные клеточные ассоциаты: скопления эмбриональных клеток называют эмбриоидными телами, а нейральных – нейросферами.

Способность давать множество разнообразных клеточных типов (плюрипотентность) делает стволовые клетки важнейшим восстановительным резервом в организме, который используется для замещения дефектов, возникающих в силу тех или иных обстоятельств.

Особое удивление биологов вызвало присутствие стволовых клеток в центральной нервной системе. Как известно, сами нервные клетки утрачивают способность к размножению уже на самой ранней стадии нейральной дифференцировки (стадии нейробласта). А стволовые клетки в ответ на различные поражения нервной ткани начинают делиться с последующей дифференцировкой в нервные и глиальные клетки. Изолированные нейральные стволовые клетки могут превращаться и в другие производные.

Обнаружить стволовые клетки можно с помощью специальных методов. Дело в том, что в «нативных» стволовых клетках и их производных синтезируются специфические белки, которые выявляются с помощью иммуногистохимической техники. На каждый белок получают антитела, которые метят флюоресцирующим красителем. Такой реагент выявляет белки, присутствующие в стволовых клетках на разных стадиях развития. Так, нейральные стволовые клетки содержат белок нестин (рис.2).

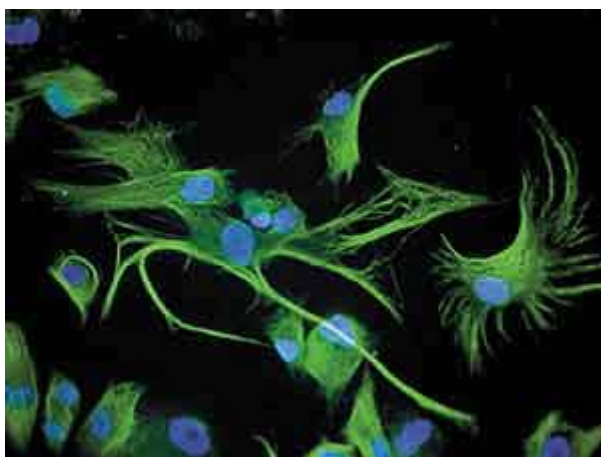


Рис.2. Культура стромальных стволовых клеток человека.

Зеленым флюоресцирует цитоплазма, содержащая нестин, синим – ядерный материал.

Когда они вступают на путь специализации, в них появляется новый белок – виментин. Если клетки развиваются в нейральном направлении, то синтезируются соответствующие маркирующие белки – нейрофиламентные, β 3-тубулин, энолаза и др. Когда клетки специализируются как вспомогательные, глиальные, появляются другие маркеры, например глиальный фибриллярный кислый белок, белок S-100 и др.

Определение стволовой клетки

Стволовая клетка – это недифференцированная клетка, способная к делению и самообновлению, полученная от эмбриона или из взрослой ткани, которая при выполнении определенных условий может развиваться в клетку со

специализированными функциями, например в клетку сердечной мышцы или клетку вырабатывающую инсулин в поджелудочной железе.

Считается, что стволовую клетку определяют два свойства - способность к длительному самовозобновлению без старения и плюрипотентность, способность дифференцироваться в один или множество специализированных типов клеток. Следовательно, теоретически эти клетки могли бы обеспечить неистощимый источник клеток для трансплантации. Тотипотентные стволовые клетки, обладающие способностью генерировать все типы тканей, играют решающую роль в развитии человеческого организма, обеспечивая "сырье" для развития всех органов и тканей эмбриона и внеэмбриональных тканей. Однако, тканеспецифические стволовые клетки расположены также в различных "нишах" организма, таких, как костный мозг, печень, мозг и кожа для обеспечения механизма поддержания ткани, ее роста и регенерации (Lavker и Sun, 2000 ; Uchida и др., 2000 ; Vessey и de la Hall, 2000 ; Wagers и др., 2002).

Стволовые клетки основные понятия

Стволовые клетки подразделяются на два основных типа – эмбриональные (тотипотентные, плюрипотентные) стволовые клетки и взрослые стволовые клетки. Эти два основных типа стволовых клеток имеют различные функции, характеристики и подтипы.

Тотипотентность

Тип клеток, из которых может быть выращен целый человеческий организм. Тотипотентными являются зигота (оплодотворённая яйцеклетка) и первые четыре клетки, получившиеся в результате её деления.

Способность клеток дифференцироваться в любую из клеток взрослого организма. В норме тотипотентность свойственна оплодотворенному яйцу (зиготе), однако в эксперименте тотипотентность может быть реализована

соматической клеткой (например, при культивировании клеток растений в виде каллусных культур с последующей регенерацией).

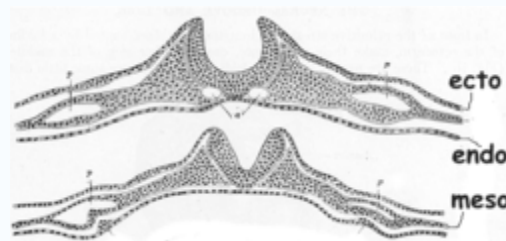
Плюрипотентность

Способность стволовой клетки развиваться в клетки разных типов. В целом, эмбриональные стволовые клетки являются плюрипотентными.

Плюрипотентные стволовые клетки

Отдельная плюрипотентная стволовая клетка способна к дифференцированию в три основных вида клеток органов - мезодерму, энтодерму и эктодерму.

Экто-, мезо- и энтодермия



Стадии внутриутробного развития человека. Формирование 3 зародышевых листков: эктодермы, мезодермы и энтодермы

На западе различают три основных типа телосложения: эктоморфный, мезоморфный и эндоморфный. Эти названия они получили от наименований трех зародышевых листков: наружного — эктодермы, из которого формируется нервная система, покровные ткани (кожа) и железы; мезодермы, из которого формируются костно-мышечная и сердечно-сосудистая система; внутреннего — энтодермы, из которого формируется пищеварительный тракт. Известно, что к концу 3-й недели развития зародыш человека имеет вид трехслойной пластинки, или трехслойного щитка. В области наружного зародышевого листка видна нервная трубка, а глубже — спинная струна, то есть появляются осевые органы зародыша человека. Тело зародыша из плоского щитка превращается в объемный, эктодерма покрывает тело зародыша со всех сторон. Из эктодермы в дальнейшем образуются нервная система, эпидермис кожи и ее производные, эпителиальная выстилка ротовой полости, анального отдела прямой кишки, влагалища. Мезодерма дает начало внутренним органам (кроме производных энтодермы), сердечно-сосудистой системе, органам опорно-двигательного аппарата (костям, суставам, мышцам), собственно коже. Энтодерма, оказавшаяся внутри тела зародыша человека, сворачивается в трубку и образует эмбриональный зачаток будущей кишки. Узкое отверстие, сообщающее эмбриональную кишку с желточным мешком, в дальнейшем превращается в пупочное кольцо. Из энтодермы формируются эпителий и все железы пищеварительной системы и дыхательных путей.

Единственный на данный момент источник этого типа стволовых клеток – внутренняя масса бластоцисты (эмбрион возраста 3-5 дней) – эмбриональные СК, а также изолированные и специальным образом культивированные клетки ткани эмбриона (возрастом от 5 до 10 дней), называемые зародышевыми стволовыми клетками. Хотя эмбриональные и зародышевые стволовые клетки относятся к типу плюрипотентных стволовых клеток их назначение, основные характеристики деления и дифференцирования различны.

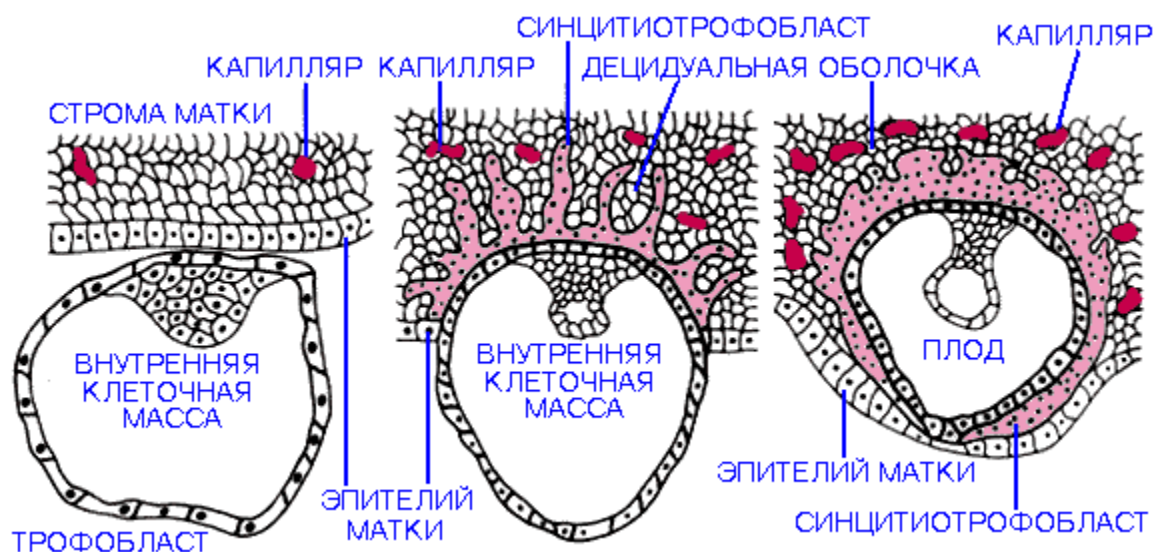
Эмбриональные стволовые клетки

Первый факт извлечения стволовых клеток у человеческого эмбриона (на животных аналогичные исследования проводятся уже более 30 лет) и последующего выращивания их в лабораторных условиях был зафиксирован в 1998 году. Исходный материал для получения культуры эмбриональных клеток подготавливается путем искусственного оплодотворения в лабораторных условиях и представляет собой 3-5 дневный эмбрион, называемый blastocyst (бластоциста).



Бластоциста – 3-5 дней после оплодотворения

Бластоциста представляет собой пустой шарик клеток двух типов: трофобластов, расположенных на поверхности, и клеток, составляющих внутреннюю массу. Внутренняя клеточная масса разовьется в плод, а трофобласты иницируют имплантацию и вместе с клетками эндометриальной ткани образуют плаценту.



Одна бластоциста (результат оплодотворения и последующего эмбриогенеза) содержит, в среднем, 30 эмбриональных стволовых клеток, составляющих её внутреннюю массу. Именно эти 30 клеток впоследствии могут стать (и постепенно становятся, уже в лабораторных условиях) основой миллиардам высокоспециализированных клеток, составляющих различные органы – кожу, легкие, сердце и т.п.

Следует, однако, заметить, что дифференцировка ЭТ не отображает всех стадий развития эмбриона, ибо не обладает ни полярностью, ни "планом строения тела". Поскольку это так, ЭС клетки не способны образовывать жизнеспособные эмбрионы.

Взрослые (соматические) стволовые клетки

Взрослая стволовая клетка - недифференцированная клетка, присутствующая в дифференцированной ткани, способная к размножению через деление и к дальнейшему дифференцированию. Основная роль взрослых стволовых клеток – восстановление поврежденных клеток ткани органов, в которых они обнаружены. Некоторые ученые называют взрослые стволовые клетки – соматическими стволовыми клетками. В отличие от эмбриональных стволовых клеток, происхождение взрослых (соматических) стволовых клеток до сих пор

неизвестно. За последние несколько лет исследования в области соматических стволовых клеток произвели маленькую революцию, поскольку они были обнаружены во многих органах, где ранее на них не обращали внимание. Некоторые виды взрослых стволовых клеток, при определенных условиях, как и эмбриональные, могут дифференцироваться во множество различных типов и их дифференцирование поддается лабораторному управлению.

История исследования взрослых стволовых клеток началась в 1960-х годах, когда ученые обнаружили, что костный мозг содержит по крайней мере два различных вида стволовых клеток. Один тип, названный *hematopoietic*, формирует все типы клеток крови, а другой, кости, хрящи, жировую и волокнистую соединительные ткани. В 1990-х ученые обнаружили, что мозг взрослого человека также содержит стволовые клетки, способные к дифференцированию в три основных типа клеток мозга – *astrocytes*, *oligodendrocytes* и нейроны.

К сожалению, чем выше степень дифференцирования клетки, тем она менее способна к делению. Так, например, нейроны практически не делятся, тогда как стволовые клетки крови имеет лимит количества делений в пределах 100.

Первоначально предполагалось, что эти "взрослые" стволовые клетки осуществляют регенерацию лишь очень незначительного числа типов клеток; однако, становится все более очевидным их существенно большая пластичность (Blau, 2001; Morrison, 2001; Prockop, 2003). Теоретически эти клетки могут быть взяты у пациента, дифференцированы в лаборатории и трансплантированы тому же пациенту для восстановления ткани, что решает, таким образом, проблему иммунного отторжения. Однако, для некоторых типов стволовых клеток низкая частота встречаемости, трудности при доступе к их местонахождению и выделении, ограниченный потенциал развития и плохой рост в клеточной культуре могут сделать их бесполезными для целей конструирования тканей (Vogel, 2001). В этих случаях ЭС клетки представляют собою более адекватный ресурс.

Дифференцирование клетки

Дифференцирование – процесс при котором неспециализированная клетка (какой является стволовая клетка) становится одной из множества типов клеток, составляющих тело или отдельный орган. В течение дифференцирования некоторые гены активируются, другие остаются в спящем состоянии, данный процесс регулируется сложнейшим механизмом, тонкости которого остаются одной из основных проблем использования стволовых клеток на практике. В результате дифференцированная клетка приобретает определенную структуру и функции. Например, зрелая клетка нерва имеет тонкие, волокнистые окончания, приспособленные для приема/передачи электрохимических сигналов другим клеткам нерва. В лабораторных условиях, могут быть созданы как полностью дифференцированные, так и частично специализированные клетки.

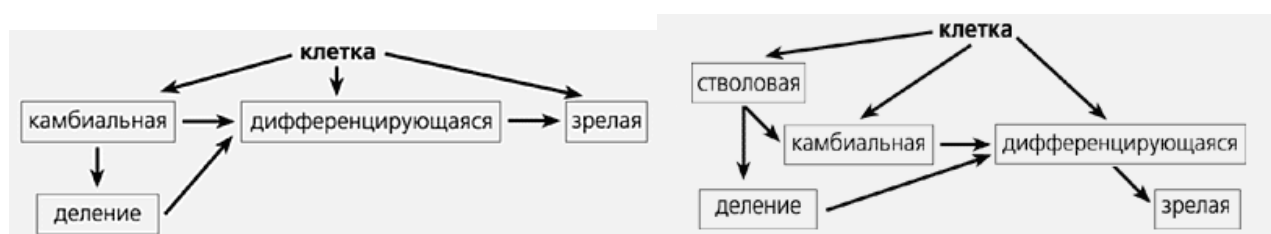
Изменились ли представления о клеточной дифференцировке с открытием стволовых клеток?

Вопреки утверждению некоторых авторов – пока нет. Во-первых, дифференцировка любых стволовых клеток происходит по законам, сформулированным для клеточной дифференцировки вообще. В этом и заключается ценность стволовых клеток как модельной системы. Во-вторых, клетки, в том числе и стволовые, начав дифференцировку, утрачивают способность к делению, по крайней мере на конечных стадиях. И, наконец, изучение поведения стволовых клеток не поколебало представлений о стабильности и необратимости клеточной дифференцировки: из фиброцита, плазматической или из париетальной клетки желудка никогда не получится нейрон, а из нейрона не возникнет кожная клетка. Тезис, что стволовая клетка способна к разного рода трансформациям, никак не нарушает это правило, а лишь демонстрирует мультипотентность, свойственную ранним эмбриональным клеткам. На стадии терминальной дифференцировки клетка

обретает стабильное состояние и теряет способность к делению и разного рода превращениям.

Что же нового дало открытие стволовых клеток во взрослом организме? Оно изменило наши представления об организации тканей и о механизмах протекающих в них восстановительных процессов. Был сделан новый и очень важный вывод: эмбриональные клетки с высоким потенциалом к развитию сохраняются и во взрослом организме. Более того, они составляют важнейшее звено в цепи репаративных процессов, о чем ранее не подозревали. Так, описывая в 70-е годы эмбриональные клетки в печени взрослой мыши (в книге «Взаимодействие генов в развитии». М., 1977), я не предполагал, что они обладают столь высоким потенциалом к развитию и принимают активное участие в репарации.

Открытие стволовых клеток повлекло необходимость замены существовавшей до сих пор схемы репаративных процессов в тканях на новую схему, отражающую существование стволовых клеток во взрослом организме.



В ходе клеточного деления из стволовых клеток возникают материнская и дочерняя клетки. Материнские используются для самоподдержания популяции, а дочерние либо «выходят» в камбиальную клетку, либо непосредственно в дифференцировку. Стволовая клетка сохраняет свойства ранних эмбриональных клеток – плюрипотентность, а камбиальная эту способность утрачивает и производит лишь региональные структуры.

Таким образом, в изучении восстановительных процессов сделан большой шаг вперед. Но предстоит еще очень много сделать, чтобы познать тонкие

механизмы поведения стволовых клеток и найти возможность использовать эти знания в клинической практике.

Ситуация в данном случае непростая. Она осложняется еще и присутствием маркеров, которые специфически «метят» стволовые клетки и их производные. В частности, в базальном, ростовом слое эпителия кожи имеется стволовых клеток 10%, а белок b1-интегрин, специфический маркер этих клеток, содержится у 40% клеток этого слоя. В связи с этим сообщения о взаимопревращениях и трансформациях кожных (да и других тоже!) стволовых клеток требуют серьезной экспериментальной проверки.

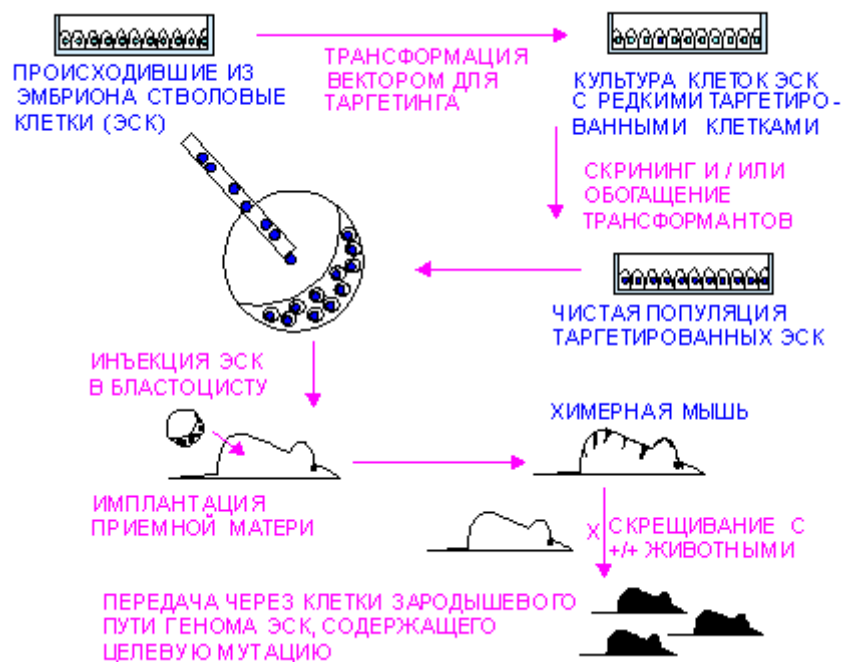
Пластичность взрослой стволовой клетки

Пластичность – способность взрослой стволовой клетки обнаруженной в одной ткани образовывать дифференцированную клетку другой ткани. Например, взрослые стволовые клетки костного мозга могут дифференцироваться как в клетки нерва, так и в специфические клетки, характерные для головного мозга. Сама концепция пластичности взрослой стволовой клетки довольно нова и полностью не изучена. Результат имеющихся исследований сводится к тому, что при определенных условиях взрослая стволовая клетка может быть генетически перепрограммирована.

Генетика СК

Эмбриональные стволовые клетки - ЭСК являются идеальной системой для направленного переноса мутаций в геном млекопитающих [Evans M.G., Kaufman M., 1981 ; Erickson R.P., 1988 ; Labosky P.A. et al., 1994].

Первичные культуры этих клеток получают из клеток бластоцисты (внутренней клеточной массы) или из первичных половых клеток ранних постимплантационных зародышей. При выращивании на питательном слое из эмбриональных фибробластов ЭСК сохраняются в недифференцированном состоянии от 3 мес. до 1 года. При этом они могут быть несколько раз заморожены и оттаяны без потери способности к дифференцировке.



ЭСК, введенные в бластоцель (полость бластоцисты), сохраняют свою тотипотентность и могут участвовать в формировании практически всех эмбриональных зачатков и органов развивающегося зародыша. В результате образуется животное - химера - состоящее из клеточных клонов двух разных типов: клеток исходного родительского генотипа и ЭСК. Если эти клетки различаются, например, по генам окраски шерсти, животное-химера - будет иметь поперечную или пятнистую окрасченность. При этом все животные, независимо образом полученные в результате введения в одинаковые по генотипу зародыши одной и той же линии клеток, будут отличаться друг от друга по характеру пятнистости, так как все химеры различны по набору клеточных клонов, развившихся и дифференцировавшихся из введенных в зародыш ЭСК. Химерные животные, у которых ЭСК дифференцировались в половые клетки и дали начало полноценным зрелым гаметам, будут устойчиво передавать своим потомкам генетическую информацию, содержащуюся в ЭСК. Таких животных иногда называют зародышевыми трансмиттерами. При скрещивании их с мышами дикого типа часть потомков будут уже гетерозиготны по мутантным генам ЭСК, т. е. будут нести мутацию в гаплоидном состоянии в каждом типе клеток. Это в равной степени относится и

к мутациям, предварительно искусственно введенным в ЭСК. Скрещивая такие гетерозиготы, можно получить животных, гомозиготных по заданной мутации. Естественно, последнее достижимо только в том случае, если мутация не окажется летальной в гомозиготном состоянии у животных этого вида.

NB!

Трансдетерминация и трансдифференцировка

В связи с необычайно широким потенциалом стволовых клеток возникает путаница с понятиями трансдетерминации и трансдифференцировки. В результате принятые в гистологии и эмбриологии терминологические правила размываются и возникает почва для бесплодных дискуссий и спекуляций.

Действительно, если трансформацию стволовых клеток в разных направлениях обозначить как трансдифференцировку (а некоторые авторы позволяют себе такую вольность), будут необоснованно разрушены представления о стабильности и необратимости дифференцировки, что ведет к невообразимой путанице. На самом деле нет никаких оснований ниспровергать существующие взгляды. Совершенно очевидно, что клетка, потерявшая способность к делению и вступившая на определенный путь развития (например, нейробласта), не может дать начало другим производным. Добиться репрограммирования ядра не так-то просто. Даже его пересадка в другую цитоплазму (в частности, при получении гетерокарионов или в опытах с пересадкой ядер), и то не всегда успешна.

Зарегистрированные случаи трансформации стволовых клеток относятся к другому событию – трансдетерминации. Процесс этот давно известен в экспериментальной эмбриологии благодаря работам выдающегося швейцарского эмбриолога и генетика Эрнста Хадорна. Описанное в ряде работ «превращение» глиальной клетки в нейрон объясняется, видимо, гетерогенностью популяции глиоцитов, т.е. некоторые из них могут сохранять свойства камбиальности, а порою и «стволовости». В таком случае обнаруженный феномен удивления не вызывает. Например, показано, что клетки так называемой радиальной глии, которая на ранних этапах онтогенеза служит субстратом для миграции дифференцирующихся нервных клеток, становятся нейронами. Однако потом выяснилось, что на самом деле популяция клеток радиальной глии гетерогенна: часть клеток содержит нейральные маркеры (они впоследствии становятся нервными), а часть – глиальные (такие и становятся глиальными). Иными словами, несмотря на то, что все клетки радиальной глии вначале выполняют одну и ту же временную функцию, они уже детерминированы к развитию в разных направлениях. Значит, обнаруженный феномен их трансформации – не трансдифференцировка, а трансдетерминация.