

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ *in vitro* как основа для создания современных биотехнологий

Л. Л. Лукаш, С. В. Василевская

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

В обзоре рассмотрены основные направления исследований с использованием стволовых клеток человека и животных: создание клеточных банков, изучение свойств полипотентных стволовых клеток и получение иммортализованных клеточных линий, роль ростовых факторов и цитокинов в дифференцировке стволовых клеток, клеточная терапия как альтернатива трансплантации органов, рекапитуляция эмбриогенеза и клонирование животных.

Введение. XXI век станет веком реконструктивной биологии, когда ученые по своим проектам смогут осуществлять сборку генов и клеток в зародышах и органах больных людей и животных. Это связано с освоением нового объекта — полипотентных стволовых клеток (SC) [1—4]. Сейчас еще трудно определить все возможные сферы их практического применения, но одной из наиболее перспективных представляется выращивание индивидуальных клеток, тканей и органов человека в условиях *in vitro*. Это становится реальным после установления того, что у каждого взрослого человека имеются собственные стволовые клетки эмбрионального происхождения [2]. Клетки являются универсальным модулем для любых реконструкций, включая пересадку генов. Введение эмбриональных стволовых клеток в организм позволяет создавать устойчивые ростки новой здоровой ткани в больных органах.

Впервые эмбриональные стволовые клетки были выделены из мышинных бластоцист почти 20 лет тому назад, и только в 1998 году — из эмбрионального материала человека [3, 4]. Одна группа исследователей выделила стволовые клетки человека из внутренней клеточной массы бластоцист, другая — из примордиальных герминативных клеток эмбриона более позднего возраста.

В последние три года произошел прорыв в области изучения стволовых клеток. Сейчас идет быстрое накопление сведений о самих SC и различных биотехнологиях с их применением. Несмотря на то, что в ряде стран был наложен мораторий на

лабораторные исследования стволовых клеток человека, этот процесс невозможно остановить, так как использование SC открывает невиданные доселе перспективы лечения различных заболеваний и продления самой человеческой жизни [5].

В данном обзоре мы рассмотрим основные направления исследований с использованием стволовых клеток человека и животных.

Создание клеточных банков. Источником биоматериала служат клеточные банки, которые берут на себя заготовку abortивного биоматериала, получение стандартизованных клеточных линий, проведение соответствующих научных исследований и многое другое, что создает необходимую базу для дальнейших разработок и клинического применения клеточных препаратов [6—9]. Различные научно-исследовательские учреждения и биотехнологические компании используют этот материал для проведения конструкторских работ на уровне клетки и генома, а также для создания искусственных органов краткосрочного и долгосрочного функционирования. Эти новые разработки фирм лицензируются и внедряются в медицину в виде весьма дорогостоящих технологий.

В США насчитывается более тысячи банков клеток и тканей человека практически во всех штатах. Банки одного профиля (например, по заготовке и хранению кожи, костного мозга, роговиц и тканей глаза) объединяются в соответствующие ассоциации тканевых и клеточных банков [1]. Эти ассоциации вырабатывают единые документы и регламенты качества органов и тканей человека.

Лицензии на открытие новых банков выдаются только при соблюдении всех принятых критериев и стандартов. Деятельность банков интегрирована единой компьютерной сетью. Самая важная тенденция последнего времени — слияние национальных банков в транснациональные. Euro Skin Bank является централизованным поставщиком биоматериалов для лечения ожогов в США и Европе. Выращивание кожи в условиях *in vitro* в настоящее время уже не представляет технических сложностей. Другая международная организация — Bone Marrow Donor Worldwide создана для обеспечения пересадок костного мозга. Международный институт новых медицинских технологий (International Institute for the Advancement of Medicine) является дилером и распределителем фетальных тканей, поставляющим фетальные ткани в 86 институтов США, а также в частные компании и лаборатории. Такие фирмы, как Systemix, специализируются на выращивании клеток и органов человека в организме иммунодефицитных животных.

Начат новый большой проект по созданию банков резервных стволовых клеток ныне живущего поколения людей [1]. Сразу же после рождения стволовые клетки ребенка вымывают из пупочной вены, размножают и замораживают для хранения на все время жизни абонента. Далее в течение жизни человека их можно ретрансплантировать для лечения наследственных заболеваний, злокачественных новообразований, иммунодефицитов, нарушений кроветворения различного генеза и т. п. Таким образом, благодаря клеточным банкам и собственному «неприкосновенному запасу» стволовых клеток человек становится застрахованным от многих наследственных, инфекционных и возрастных заболеваний.

Изучение свойств стволовых клеток и получение иммортализованных клеточных линий. На основании полученных к настоящему времени данных можно выделить тотипотентные эмбриональные стволовые клетки (ESC), способные дать начало целому организму, и региональные стволовые клетки с определенным ограничением возможностей, способные дать начало отдельным тканям и органам. Можно представить себе следующую схему иерархии родоначальных клеток в ходе их становления и развития. Сразу же важно оговорить, что предлагаемая схема носит весьма условный характер и будет уточняться и дополняться по мере появления новых данных.

Яйцеклетка в результате оплодотворения ее сперматозоидом получает импульс к делению и становится стволовой клеткой первого порядка, способной дать начало целому организму. Следует

признать, что не только оплодотворенная яйцеклетка, но и первые бластомеры, образующиеся при ее делении, тотипотентны. Об этом свидетельствует такой хорошо известный феномен, как появление на свет однояйцевых близнецов. На экспериментальных объектах, мышах, подтверждено полное сохранение тотипотентных свойств у бластомеров, продемонстрирована возможность получения химерных животных [6].

Эмбриональные стволовые клетки дают начало всем трем зародышевым листкам: эктодерме, энтодерме и мезодерме. Имеются сведения о том, что с помощью набора ростовых факторов исследователи пытаются направлять дифференцировку эмбриональных стволовых клеток в сторону того или иного зародышевого листка, но пока еще не удается получить клетки одного определенного типа [10]. Возможно, клетки зародышевых листков взаимозаменяемы и взаимопревращаемы. При делении клеток зародышевых листков, которые, вероятно, являются стволовыми клетками второго порядка, образуются региональные стволовые клетки. И, наконец, при делении региональных стволовых клеток или SC третьего порядка появляются клетки-предшественники, которые на определенном этапе дифференцировки превращаются в специализированные ткани организма и претерпевают, вероятно, необратимые изменения. Так, например, в результате коммитации происходит становление трех ростков кроветворения.

К настоящему времени получены и охарактеризованы иммортализованные линии эмбриональных стволовых клеток человека, по-видимому, сохраняющие тотипотентные свойства [6, 10]. Как уже отмечено выше, доказательством сохранения тотипотентных свойств стволовой клетки является способность к возобновлению эмбриогенеза при подсадке ее в организм псевдобеременной самки. Выделенные из организма ESC сохраняют способность к неограниченному размножению при культивировании в жидких средах над фидерным клеточным слоем при добавлении трех основных цитокинов: фактора роста стволовых клеток (SCF), лейкемииингибирующего фактора (LIF) и интерлейкина-3 (IL) [6, 10]. При делении ESC *in vitro* в определенных условиях образуются эмбриоидные тела, состоящие из клеток — предшественников различных тканей и органов. Получены также линии трофобластных стволовых клеток (TSC), которые могут дифференцироваться в соответствующие структуры, обеспечивающие питание зародыша [10]. Но вопрос о возможности выращивания организмов в условиях *in vitro* требует глубокой теоретической и экспериментальной проработки.

Главный прорыв в последнее десятилетие связан с выделением, культивированием и созданием линий нейрогенных стволовых клеток (NSC) [6, 11, 12]. Попытки выделения NSC из мозга взрослых млекопитающих вначале казались бесперспективными, поскольку считалось общепризнанным, что мозговая ткань не регенерирует. Линии NSC удалось получить при использовании мозга фетусов 1-го триместра беременности, который на 90 % состоит из стволовых клеток различного уровня.

Значительный прогресс в настоящее время достигнут в изучении гематогенных стволовых клеток (GSC) [13, 14]. По мнению многих исследователей, в основе гемопоэза как постоянно обновляющейся системы лежит единая полипотентная GSC, способная к длительному, возможно, неограниченному самоподдержанию. В процессе ее деления происходят дифференцировка и формирование клонов клеток, различающихся по цитоморфологическим, иммунофенотипическим и дифференцировочным признакам. Вначале образуются примитивные, а затем коммитированные клетки-предшественники, из которых впоследствии формируются морфологически распознаваемые родоначальные клетки различных ростков кроветворения. Таким образом, кроветворение представляет собой сложный многостадийный процесс, завершающийся выходом в периферическую кровь зрелых форм: эритроцитов, лейкоцитов, лимфоцитов и тромбоцитов.

Известно, что в процессе эмбрионального развития млекопитающих происходит естественная смена локализации кроветворения, которое первоначально осуществляется в желточном мешке, а затем перемещается в печень, селезенку и, наконец, в костный мозг [15] путем миграции и внедрения в новое микроокружение полипотентных стволовых клеток. На начальных стадиях эмбрионального развития кроветворная ткань обогащена стволовыми клетками, а затем в ходе становления взрослого кроветворения их доля в популяции снижается. Поэтому наиболее перспективно для получения гематогенных SC использовать раннюю эмбриональную ткань (например, печень 5—8-недельной гестации).

Выявление маркерных антигенов на поверхностных мембранах и в цитоплазме гемопоэтических и лимфоидных клеток позволило охарактеризовать различные этапы гемопоэза в эмбриональном и постнатальном периодах, уточнить отдельные стадии дифференцировки. Показано, что процесс коммитации сопровождается изменением антигенного профиля: снижением уровня экспрессии антигена CD34 и Thy-1, повышением уровня экспрессии антигенов CD38 и CD45RA, появлением антигена

HLA-DR [13, 14]. В процессе последующей дифференцировки начинается экспрессия антигенов, специфичных для гемопоэтических клеток определенного ряда [16].

Антиген CD34 признан основным антигеном стволовой кроветворной клетки, несмотря на то, что он экспрессирован также на мембране стромальных клеток костного мозга [17] и эндотелиальных клеток [18]. В настоящее время он широко используется для выделения, обогащения и очистки стволовых клеток, а также клеток-предшественников костного мозга человека. Коммитация клеток-предшественников связана, прежде всего, со снижением уровня экспрессии CD34. Зрелые предшественники, эритроцитарные, гранулоцитарные и моноцитарные имеют либо пониженное содержание антигена CD34, либо он практически отсутствует (фенотип CD34⁻). На поверхностной мембране дифференцированных клеток костного мозга и крови антиген CD34 не обнаружен. Молекула CD34 представляет собой мембранный гликопротеин (примерно 110 кДа), несущий множество потенциальных сайтов гликозилирования. Ген, кодирующий CD34, локализован в 1-й хромосоме. Функция антигена CD34 остается неизвестной, однако предполагают, что он играет важную роль в гемопоэзе и может быть вовлечен во взаимодействие стромальных и гемопоэтических клеток.

Популяция клеток костного мозга, описываемая формулой CD34⁺CD38⁻, обогащена примитивными стволовыми клетками, имеющими миелоидный и лимфоидный дифференцировочные потенциалы. Некоторым авторам удалось в условиях длительного культивирования примитивных GSC генерировать все ростки кроветворения: нейтрофильные, эозинофильные, базофильные гранулоциты, моноциты, мегакариоциты, эритроциты, T-лимфоциты [19].

Популяция клеток костного мозга с фенотипом CD34⁺CD38⁺ содержит клетки-предшественники, обладающие ограниченной пролиферативной и дифференцирующей способностью. Таким образом, коммитированные и некоммитированные клетки-предшественники, по мнению большинства исследователей, можно различать, используя моноклональные антитела к антигену CD38, который экспрессирован на поверхности 99 % клеток костного мозга с фенотипом CD34⁺. Этот антиген — интегральный мембранный гликопротеин с молекулярной массой 46 кДа, углеводный компонент которого составляет до 20 % молекулярной массы. Он представляет собой фермент, обладающий активностью NAD-гликогидролазы, а также ADP-рибозилциклазы, участвующей в поступлении циклической

ADP-рибозы в клетку и регуляции ее продукции [20].

Экспрессия антигена Thy-1⁺ характерна для наиболее незрелых костномозговых клеток фенотипа CD34⁺ [21]. Показано, что единичные клетки CD34⁺ Thy-1⁺ способны дать начало длительно культивируемым линиям. При этом генерируются коммитированные дочерние клетки. Антиген Thy-1 (CD90) идентифицирован как поверхностный гликопротеин с молекулярной массой 25—35 кДа. Функция его неизвестна, но предполагают, что он способен погасить негативный сигнал, приводящий к остановке деления клеток, и, возможно, участвует в процессах адгезии [22]. Антиген Thy-1 ко-экспрессирует с рецептором c-kit (CD117) на клетках с фенотипом CD34⁺, выделенных из костного мозга, пуповинной и периферической крови.

Очевидно, существует определенная иерархия гематогенных стволовых клеток, и различные классы клеток можно различать как с помощью цитоморфологических методов, так и по антигенному составу. В связи с этим предпринимались многочисленные попытки создания единой схемы кроветворения на основе достижений в области изучения родоначальных гемопоэтических клеток. Наибольшее признание получила схема кроветворения, предложенная Чертковым и Воробьевым [23], а также группой французских гематологов во главе с Матэ [24].

Итак, в настоящее время экспериментально подтверждено существование GSC и уточняются иммунофенотипические характеристики стволовых клеток и примитивных клеток — предшественников гемопоэза. С помощью специфических моноклональных антител GSC выделяют из эмбриональной печени, пуповинной крови, костного мозга и периферической крови

Роль ростовых факторов и цитокинов в поддержании и дифференцировке стволовых клеток. В регуляции пролиферации и дифференцировки стволовых клеток участвует сложнейшая система ростовых факторов и цитокинов, вырабатываемых как самими клетками, так и клетками микроокружения, стромы и внеклеточного матрикса [1, 6, 13]. Использование очищенных клеточных популяций и бессывороточных сред для культивирования клеток позволило охарактеризовать ростовые факторы, оказывающие стимулирующее и ингибирующее влияние на стволовые клетки различного уровня, клетки-предшественники и клетки, специализированные в том или ином направлении.

Так, к настоящему времени клонировано и получено в виде очищенных рекомбинантных препаратов свыше 20 цитокинов, поддерживающих

размножение и функциональную активность гемопоэтических клеток [13, 14]. Все время появляются сведения об обнаружении новых цитокинов [25]. Множество цитокинов комплексно воздействует на различные классы кроветворных клеток-предшественников, связываясь с рецепторами клеток-мишеней. Среди наиболее изученных цитокинов — фактор роста стволовых клеток, эритропоэтины, колониестимулирующие факторы, интерлейкины, интерфероны и др.

Добавление SCF и других цитокинов в ростовую среду обеспечивает длительное культивирование эмбриональных и региональных стволовых клеток [6]. В комплексе с IL-11 планируется использование SCF в клинике для лечения больных с гипо- и апластическими состояниями кроветворения.

SCF стимулирует рост клеток-предшественников всех трех ростков кроветворения: лимфоидных, миелоидных, эритроидных [13, 14]. При этом он действует в комплексе с гранулоцитарным колониестимулирующим фактором, IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-11, эритропоэтином, тромбопоэтином, Flt3-лигандом, белком gp130 и фактором роста гепатоцитов [26—31]. Вероятно, SCF взаимодействует также с интерфероном гамма [32].

SCF обеспечивает образование и созревание тучных клеток и их функционирование [33]. Описаны случаи выделения из эмбриональной печени или пуповинной крови тучных клеток и длительного поддержания их в бессывороточных средах, содержащих SCF и IL-3.

Для размножения эмбриональных SC и клеток — предшественников гемопоэза важное значение имеет LIF [34]. Фактор роста фибробластов, являющийся политропным цитокином, оказывает стимулирующее влияние на примитивные гематогенные SC, клетки — предшественники мегакариоцитарного ряда и стромальные клетки костного мозга [35]. IL-3 оказывает негативное регулирующее влияние на стволовые клетки и предшественники В-лимфоцитов мыши в культуре [36]. Инсулиноподобные факторы роста 1 и 2 оказывают воздействие на пролиферацию и дифференцировку эритроидных и миелоидных клеток-предшественников [37]. Фактор роста гепатоцитов вместе с другими ростовыми факторами оказывают синергическое воздействие на клетки — предшественники гемопоэза [38]. Тромбоцитарный фактор роста действует прямо на клетки — предшественники эритроидного и гранулоцитарного ряда и опосредованно — на гематогенные стволовые клетки [39]. Выделены и охарактеризованы цитокины, ингибирующие гематогенные SC и клетки-предшественни-

ки, но стимулирующие созревание дифференцированных клеток крови. Так, например, интерфероны альфа, гамма и, в меньшей степени, бета, действуя синергически, подавляют рост клеток-предшественников [40]. Трансформирующий фактор роста бета подавляет рост примитивных клеток-предшественников, но стимулирует рост более зрелых форм, таких как КОЕ-ГМ [41].

Цитокины действуют, связываясь со специфическими рецепторами на клеточной мембране. Рецепторы к ранним ростовым факторам широко представлены на поверхности различных типов клеток. Рецепторы к SCF (CD117) выявлены на поверхности эмбриональных стволовых клеток, региональных стволовых клеток, частично и полностью коммитированных клеток — предшественников гемопоэза, тучных клеток, меланоцитов, нервных клеток плода [42]. Экспрессия рецептора VEGF является самым ранним маркером образования гемангиобластов. Йамашита и соавт. показали, что клетки с фенотипом Flk1⁺, ведущие свое происхождение от эмбриональных стволовых клеток, дают начало не только гемопоэтическим клеткам, но и двум типам клеток, которые составляют основу кровеносных сосудов как в условиях *in vitro*, так и в условиях *in vivo*. Полученные данные указывают на перспективу использования полипотентных стволовых клеток для конструирования сосудистой ткани [43].

В литературе приводятся впечатляющие примеры изменения направления дифференцировки стволовых клеток под влиянием цитокинов не только в условиях *in vitro*, но и *in vivo*. В обзоре [6] приведен случай, когда после трансплантации кроветворных стволовых клеток пациенту с тяжелым наследственным заболеванием донорские моноциты мигрировали через гематоэнцефалический барьер и превращались в типичные клетки мозговой ткани, нейроглии. Это указывает на возможность взаимного превращения одного типа региональных стволовых клеток в другой под влиянием соответствующих цитокинов и микроокружения.

Трансплантация клеток — альтернатива трансплантации органов. В 1996 г. журнал «Тайм» в специальном выпуске, посвященном трансплантации, привел следующие данные. За три года в США было перелито 7 млн л крови 9 млн пациентов, выполнено 2400 операций по пересадке сердца, около 1400 пересадок почек, 23000 — печени, 150000 — костно-хрящевой ткани, 700 — перикарда, 60000 — клапанов сердца, 12000 — костного мозга, около 7000 пересадок роговицы и около 6000 квадратных метров кожи.

В США ежегодно около 5000 человек нужда-

ются в трансплантации, но меньше четверти больных получают спасительную операцию, остальные находятся на «листе ожидания» и умирают без хирургической помощи из-за отсутствия совместимой донорской ткани [1]. В Германии, Англии и Франции в год около 15000 пациентов умирают, не дождавшись операции. В странах СНГ этот вид медицинской помощи поддерживается лишь благодаря энтузиазму ученых и спонсорству частных предпринимателей. Дефицит качественных донорских органов, рост числа пациентов на «листе ожидания», большая стоимость операции, а также различные послеоперационные осложнения заставили заниматься трансплантацией соматических клеток человека в качестве альтернативы пересадок целого органа.

Новая область микрохирургии, трансплантация клеток, превращается в одно из лидирующих направлений медицины. Тесная связь с молекулярной и клеточной биологией быстро привела к развитию новых технологий выращивания стволовых и специализированных клеток человека, генетической трансформации их в культуре с последующей имплантацией в организм человека и животных. В сумме на эту область медицины сейчас уходит добрая половина федерального бюджета Министерства здравоохранения США. Огромные средства выделяются странами Западной Европы. Щедрые инвестиции в эту область идут от крупнейших частных компаний, поскольку капиталовложения быстро окупаются.

Ряд новейших технологий по трансплантации фетального клеточного материала уже используется в клиниках США и Европы для лечения иммунодефицитных состояний, нарушений гемопоэза, заболеваний печени, мышечных дистрофий, дегенеративных изменений нервной ткани, репродуктивной системы, костной, хрящевой и покровных тканей [6]. Наиболее показательны пересадки соматических клеток при заместительной терапии фатальных иммунодефицитов и при генной терапии наследственных патологий. Техника трансгенных животных позволяет создавать адекватные модели наследственных заболеваний человека и отрабатывать на них новые методы лечения [7].

В трансплантологии в качестве клеточного материала могут использоваться эмбриональные стволовые клетки, региональные стволовые клетки и специализированные соматические клетки [6]. В качестве примеров трансплантации специализированных соматических клеток можно привести пересадки трансфицированных миобластов или фибробластов пациентам с мышечной дистрофией Дюшенна [1], изолированных островков Лангерганса —

пациентам с инсулинзависимым диабетом [8], гепатоцитов — пациентам с острой печеночной недостаточностью [9].

Трансплантация эмбриональных клеток имеет явные преимущества перед использованием специализированных клеток взрослых доноров, так как в первом случае уменьшается на порядок число случаев отторжения чужеродной ткани благодаря слабой экспрессии антигенов главного комплекса гистосовместимости в случае первого типа клеток [6]. Кроме того, вместе с эмбриональными клетками в организм пациента привносится уникальный комплекс цитокинов и ростовых факторов.

Все чаще вместо первичных клеток используются стандартизованные линии иммортализованных клеток человека, имеющие целый ряд преимуществ [1, 6, 10]. С одной стороны, применение последних позволяет уйти от решения некоторых этических вопросов, связанных, например, с применением абортивного человеческого материала. С другой, — применение гомогенного клеточного материала уменьшает риск отторжения по сравнению с пересадками органов, содержащих эндотелиальную ткань, обогащенную антигенными детерминантами. Немаловажным обстоятельством является и меньшая себестоимость клеточных трансплантаций по сравнению с пересадкой целых органов.

Как правило, для практических целей из ESC человека под влиянием соответствующих цитокинов получают региональные стволовые клетки, прошедшие первые этапы дифференцировки в условиях *in vitro*: нейрональные прогениторные, кардиомиобласты, миообласты скелетных мышц, мезенхимальные стволовые клетки, бластные клетки эндодермальных органов [1, 6]. Последние при введении в ткани взрослого организма способны создавать новые устойчивые ростки специализированных клеток [44].

Начало реконструктивной нейрохирургии было положено позитивными примерами лечения болезни Паркинсона, которая обусловлена дефицитом дофамина [6]. Вначале в качестве источника дефицитного медиатора использовали эмбриональную нервную ткань без подраживания и с подраживанием *in vitro*. Однако использование абортивных тканей не позволяло добиться хорошей воспроизводимости результатов. Это усугублялось еще и необходимостью смешивания нервной ткани от нескольких эмбрионов для получения достаточного количества материала.

Следующий этап связан с выращиванием нейрогенных стволовых клеток в культуре [45]. Вначале был разработан метод препаративного получения очищенных стволовых клеток из головного

мозга крысы с последующим культивированием в присутствии ростовых факторов. Замена ростовых факторов на индукторы клеточной дифференцировки позволяла получить достаточное количество нейробластов, продуцирующих дофамин. Эксперименты на модельных животных с синдромом паркинсонизма показали, что пересадки донорских нейробластов в значительной степени снимают моторные расстройства и ригидность. Ранние эмбриональные клетки развивающейся нервной системы обладают высокой агрессивностью в плане встраивания и рекапитуляции морфогенеза, а также обладают способностью к длительному (более 1 года) выживанию в зрелой ткани реципиента.

Наконец, были получены и охарактеризованы иммортализованные линии эмбриональных стволовых клеток человека Tera-1, Tera-2, NTERA [6, 10, 11]. После размножения и накопления достаточного количества стволовых клеток в среде с нейротрофинами их переводят в другую среду, содержащую вещество, индуцирующее дифференцировку. В качестве индукторов дифференцировки используют ретиноевую кислоту или гексаметилендиацетамид. Превращение ESC в нейробласты регистрируют по биохимическим и электрофизиологическим показателям, а также по поведению клеток в организме экспериментальных животных. Нейробласты теряют способность к неограниченному размножению и начинают производить нейромедиатор: белок нестин [46]. Изменение свойств клеток в правильном направлении доказывается потерей способности к неограниченному размножению при подкожном введении их экспериментальным животным. При введении нейробластов животным с поврежденным спинным мозгом они ускоряют восстановление мозговой ткани [11, 12, 45, 46].

Последние результаты показывают, что стандартные линии NSC, полученные в культуре, обладают целым рядом преимуществ при лечении посттравматических повреждений спинного и головного мозга в экспериментальных условиях и в клинике [6]. Донорские нейробласты, имплантированные в разную среду обитания, способны превращаться в специализированные клоны нейронов и нейроглии, причем факторы микроокружения существенно влияют на направление специализации клеток. В ткани после трансплантации клеток формируются химерные нейронные сети из донорских и реципиентных клеток, что обеспечивает регенерацию в месте физического повреждения или формирования рубца.

В литературе даются убедительные примеры лечения последствий травм и инсульта. Причем успех хирургической операции по поводу перене-

сенного инсульта напрямую связывают с высоким качеством иммортализованной клеточной линии [6]. Ожидается быстрый прогресс в лечении таких тяжелых наследственных патологий, как синдром Дауна и синдром хрупкой X-хромосомы, при которых происходит недоразвитие межклеточных сетей нейронов с компенсаторным разрастанием глиальных популяций [47].

Все большее практическое применение находят гематогенные стволовые клетки при лечении заболеваний крови, злокачественных новообразований [13, 14].

Значительные успехи достигнуты в трансплантации клеток кожной ткани, выращенной в условиях *in vitro* [48, 49].

Рекапитуляция эмбриогенеза и клонирование животных. Выделение эмбриональных стволовых клеток человека открывает перспективы в плане рекапитуляции эмбриогенеза, что еще не в полной мере осознано учеными [1, 10]. Огромную роль в развитии этого направления сыграло создание специальной микротехники пересадки ядер соматических клеток. Вначале пересадкой ядер головастиков в цитоплазму ооцитов удалось клонировать лягушек, потом — получить межвидовых гибридов грызунов. Особо следует выделить успехи трансплантологии в изучении эмбриогенеза низших и высших организмов [1]. Пересадки бластомеров проложили путь к лабораторному получению аллофенных мышей и крыс, собранных из гетерогенных бластомеров. Эта техника используется для изучения закономерностей органогенеза, путей расселения и колонизации эмбриональных клонов в развивающемся зародыше. Аллофенные зародыши и пересадки эмбриональных стволовых клеток, меченных маркерными генами, позволили проследить этапы клональной сборки эпителия, эндотелия, кожи и других тканей. Сейчас удается подсчитать, из какого числа исходных клонов формируется тонкая кишка, печень и секреторные железы, каковы соотношения стволовых и дифференцированных клеток в разных тканях.

Этими экспериментами был проложен путь к опытам по клонированию животных. В мае 1997 г. появилось сообщение Вильмута и Кемпбелла о клонировании зародышей овцы [50]. Схема эксперимента была следующей. С помощью суперовуляции получали десятки неоплодотворенных реципиентных яйцеклеток овцы породы Scottish Blackface. Из яйцеклеток с помощью микроманипулятора удаляли пронуклеус. Донорские клетки выделяли из эпителия молочной железы овцы другой породы Finn Dorset. Яйцеклетку без ядра и эпителиальную клетку присасывали к концу микропипетки. Когда

две клетки образовывали плотный контакт, дважды пропускали электрический разряд. Первый электроразряд применялся для слияния двух клеток, второй — для запуска «кортикальной реакции» и последующих событий, запускающих дробление зародышевой клетки. Авторы получили патент на метод слияния и клонирования химерных зародышевых клеток.

Дробление и формирование бластоцист проходило в культуре. Затем бластоцисты имплантировали в матку гормонально подготовленной «псевдоматери» — овцы породы Finn Dorset. Пересаженные в матку «псевдоматери» зародыши нормально развивались, и ягнята родились в срок. Новорожденные животные не имели внешних аномалий развития и сохраняли генотип и фенотип овцы Finn Dorset. Эти результаты показали, что ДНК соматических клеток содержит всю необходимую информацию для эмбрионального развития, которая автоматически считывается в цитоплазме активированной яйцеклетки.

Д. Вольф из Орегонского исследовательского центра приматов впервые сумел клонировать зародышей обезьян без половых клеток, трансплантируя в яйцевод только эмбриональные стволовые клетки [1]. Затем нормальные зародыши и плоды были получены у коров, овец и кроликов также пересадкой эмбриональных стволовых клеток. Наложены внутриматочные пересадки эмбриональных стволовых клеток человека зародышам овцы. Инкуляция стволовых гематогенных клеток фетальной печени человека в зародыш овцы на стадии органогенеза приводила к рождению животных-химер. В крови и костном мозге таких овец стабильно определялось 3—5 % гематогенных клеток человека. Клоны человеческих клеток не меняли своего кариотипа, стабильно сохраняли темп пролиферации и цитодифференцировку. Они не элиминировались иммунной системой и фагоцитами хозяина и не трансформировались в опухолевые.

В настоящее время активно разрабатываются теоретические и экспериментальные подходы для рекапитуляции эмбриогенеза из эмбриональных зародышевых клеток, трансфицированных «полезными» генами человека (эритропоэтин, инсулин, гормоны и ростовые факторы). Фактически создается новая отрасль: индустриальное «гуманизированное» животноводство, где домашние животные становятся лабораториями и фабриками биологически активных соединений человека. Кроме того, иммунодефицитные «гуманизированные» животные могут использоваться для наработки стволовых и специализированных клеток человека в неограниченных количествах.

Таким образом, в настоящее время на основе эмбриональных стволовых клеток разработана технология получения генетических мозаиков, межвидовых химер, а также эмбрионального клонирования. Невозможно предугадать, какие открытия ожидают биологию на путях экспериментирования с движущими силами эмбриогенеза.

Заключение. В мире совершен прорыв в области получения и изучения стволовых клеток человека и животных, а также создания технологий на их основе. Усовершенствование техники культивирования и использование очищенных рекомбинантных цитокинов позволяют в настоящее время получать иммортализованные линии стволовых клеток, а также осуществлять первые стадии дифференцировки *in vitro*. А это в свою очередь открывает перспективы перехода на новый уровень диагностики и лечения в медицине. Уже сейчас отмечен прогресс в трансплантологии, обусловленный использованием не первичного биоматериала, а стандартизированных клеточных препаратов. Появилась принципиальная возможность выращивания не только клеток, но и индивидуальных тканей, а также органов и организмов в условиях *in vitro*.

Создана технология, позволяющая осуществлять рекапитуляцию эмбриогенеза и клонирование животных. При использовании эмбриональных стволовых клеток одного вида млекопитающих можно осуществлять массовое тиражирование животных-близнецов, а при использовании SC различного видового происхождения удается получать химерных животных, обнаруживающих признаки обоих родителей. Клонированных животных используют для научных исследований и разработки новых биотехнологий.

L. L. Lukash, S. V. Vasilovskaya

Mammalian stem cells *in vitro* as a basis for the development of new biotechnologies

Summary

In this review we considered the main directions of the research using stem cells of human and animals: the creation of cellular banks, an investigation of the properties of the polipotent stem cells and obtaining of immortal cell lines, a role of growth factors and cytokines in the differentiation of the stem cells, cell therapy as an alternative of organ transplantation, recapitulation of the embryogenesis and animal cloning.

Л. Л. Лукаш, С. В. Васильовська

Стволові клітини ссавців *in vitro* як основа для створення сучасних біотехнологій

Резюме

В огляді розглянуто основні напрямки досліджень з використанням стволових клітин людини і тварин: створення

клітинних банків, вивчення властивостей поліпотентних стовбурових клітин і одержання іморталізованих клітинних ліній, роль ростових факторів та цитокінів у диференціюванні стовбурових клітин, клітинна терапія як альтернатива трансплантації органів, рекапітуляція ембріогенезу та клонування тварин.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Репин В. С., Сухих Г. Т. Медицинская клеточная биология.—М.: Изд-во Рос. акад. мед. наук, 1998.—200 с.
2. Johansson C. B., Svensson M., Wallstedt L., Janson A. M., Frisen J. Neural stem cells in the adult human brain // *Exp. Cell Res.*—1999.—253.—P. 733—736.
3. Thomson J. A., Hskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz A., Swiergiel J. J., Marshall V. S., Gones J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // *Science.*—1998.—282.—P. 1145—1147.
4. Shambloft M. J., Axelman J., Wang Sh., Bugg E. M., Littlefield J. W., Donovan P. J., Blumenthal P. D., Huggins G. R., Gearhart J. D. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1998.—95.—P. 13726—13731.
5. Annas G. J., Caplan A., Elias S. Stem cell politics, ethics and medical progress // *Nature Med.*—1999.—5, N 12.—P. 1339—1341.
6. Сухих Г. Т. Трансплантация фетальных клеток в медицине: настоящее и будущее // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.*—1998.—126, прил. 1.—С. 3—13.
7. Vogel G. Stem cells: new excitement, persistent questions // *Science.*—2000.—290.—P. 1672—1674.
8. Шумаков В. И., Блюмкин В. И., Скалецкий Н. Н. Трансплантация островковых клеток поджелудочной железы.—М., 1995.
9. Gupta S. et al. Studies on the safety of intrasplenic hepatocyte transplantation—relevance to *ex vivo* gene therapy and liver repopulation in acute hepatic failure // *Hum. Gene Ther.*—1993.—4, N 3.—P. 249—258.
10. Schuldiner M., Yanuka O., Itsovitz-Eldor P., Douglas A. M., Benvenisty N. Effect of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2000.—97.—P. 11307—11312.
11. McDonald J. W., Liu X-Z., Qu Y., Liu S., Mickey Sh. K., Turetsky D., Gottlieb D. I., Choi D. W. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord // *Nature Medicine.*—1999.—5, N 12.—P. 1410—1412.
12. Svendsen C. N., Smith A. G. New prospects for human stem-cell therapy in the nervous system // *Neuroscience.*—1999.—22.—P. 357—364.
13. Глузман Д. Ф., Абраменко И. В., Скляренко Л. М., Надгорная В. А. Стволовые кроветворные клетки и клетки-предшественники миелопоэза // *Лаб. диагностика онкогематол. заболеваний.*—Киев: МОРИОН, 1998.—С. 25—41.
14. Чертков И. Л., Дризе Н. И. Как обеспечивается поддержание кроветворной системы // *Гематология и трансфузиология.*—1998.—4.—С. 3.
15. Приндул Г. Гемопоз в желточном мешке. Гематология и трансфузиология.—1998.—3.—С. 14.
16. Николаенко Н. С. Эмбриональные стволовые клетки в культуре и их направленная дифференцировка (краткий обзор) // *Клеточные культуры.*—Санкт-Петербург: ЗАО «Познание», 2001.—С. 24—27.
17. Simmons P. J., Torok-Storb B. CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow // *Blood.*—1991.—78.—P. 2848.

18. *Shamblott M. J., Axelman J., Littlefield J. W., Blumenthal P. D., Huggins G. R., Linzhao Y. C., Gearhart J. D.* Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively *in vitro* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2001.—98.—P. 113—118.
19. *Huang S., Terstappen L. W. M. M.* Formation of haemopoietic microenvironment and haemopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells // *Nature.*—1992.—360.—P. 745.
20. *Sutherland H. J., Landsdorph P. M., Henkelman D. H., Eaves A. C., Eaves C. J.* Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow-stromal layers // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1990.—87.—P. 3584—3588.
21. *Audet J., Zandstra P. W., Eaves C. J., Piret J. M.* Advances in hematopoietic stem cell culture // *Curr. Opin. Biotechnol.*—1998.—9.—P. 146—151.
22. *D'Arena G., Musto P., Cascavilla N. et al.* Thy-1 (CDw90) and c-kit receptor (CD117) expression on CD34⁺ hematopoietic progenitor cells: a five dimensional flow cytometric study // *Hematologica.*—1998.—83.—P. 587.
23. *Чертков И. Л., Воробьев А. И.* Сщвременная схума крове-творения. // *Пробл. Гематологии и переливания крови.*—1973.—10.—С. 3.
24. *Mathe G., Dantchev D., Pouillart P., Florentin J.* De l'hema-тология avec a l'hematologie sans microscope // *Nouv presse med.*—1972.—1.—P. 3135.
25. *Kishimoto T., Taga T., Akira S.* Cytokine signal transduction // *Cell.*—1994.—76.—P. 253—262.
26. *Roeder I., de Haan G., Engel C., Nijhof W., Dontje B., Loeffler M.* Interactions of erythropoietin, granulocyte colony-stimulating factor, stem cell factor and interleukin-11 on murine hematopoiesis during simultaneous administration // *Blood.*—1998.—91.—P. 3222—3229.
27. *Matsunaga T., Kato T., Miyazaki H., Ogawa M.* Throm-бopoietin promotes the survival of murine hematopoietic long-term reconstituting cells: comparison with the effects of FLT3/FLK-2 ligand and interleukin-6 // *Blood.*—1998.—92.—P. 452—461.
28. *Lyman S. D., Jacobsen S. E. W.* C-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct ac-tivities // *Blood.*—1998.—91.—P. 1101—1134.
29. *Lauffenburger D. A., Chu L., French A., Ochrtman G., Reddy C., Wells A., Niyogi S., Wiley H. S.* Engineering dynamics of growth factors and other therapeutic ligands // *Biotechnol. and Bioeng.*—1996.—52.—P. 61—80.
30. *Broudy V. C.* Stem cell factor and hematopoiesis // *Blood.*—1997.—90.—P. 1354—1364.
31. *Weimar IS., Miranda N., Muller E. J. et al.* Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) is produced by human bone marrow stromal cells and promotes proliferation, adhesion and survival of human hematopoietic progenitor cells (CD34⁺) // *Exp. Gematol.*—1998.—26, N 9.—P. 885—894.
32. *Brugger W., Mocklin W., Heimfeld S., berenson R. J., Mertelsmann R., kanz L.* *Ex vivo* expansion of enriched peripheral blood CD34⁺ progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1 beta (IL-1), IL-6, IL-3, interferon-gamma, and erythropoietin // *Blood.*—1993.—81, N 10.—P. 2579—2584.
33. *Gaca M. D., Pickering J. A., benyon R. C.* Human and rat stellate cells produce stem cell factor: a possible mechanism for mast cell recruitment in liver fibrosis // *J. hepatol.*—1999.—30, N 5.—P. 850—858.
34. *Fletcher F. A., Williams D. E., Maliszewski C. Et al.* Murine leukemia inhibitory factor enhances retroviral-vector infection efficiency of hematopoietic progenitors // *Blood.*—1990.—76.—P. 1098.
35. *Bruno E., Cooper R. J., Wilson E. L. et al.* Basic fibroblast growth factor promotes the proliferation of human mega-karyocyte progenitor cells // *Blood.*—1993.—82.—P. 430.
36. *Matsunaga T., Hirayama F., Yonemura Y., Murray R., Ogawa M.* Negative regulation by interleukin-3 (IL-3) of mouse early B-cell progenitors and stem cells in culture: transduction of the negative signals by beta c and beta IL-3 proteins of IL-3 receptor and absence of negative regulation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor // *Blood.*—1998.—92.—P. 901—907.
37. *Merchav S., Tatarsky I., Hochberg Z.* Enhancement of human granulopoiesis *in vitro* by biosynthetic insulin-like growth factor-1/somatomedin C and human growth hormone // *J. Clin. Invest.*—1988.—81.—P. 791.
38. *Kmieciak I. E., Keller J. R., Rosen E., Vandewoude G. F.* Hepatocyte growth factor is a synergistic factor for growth of hepatopoietic progenitor cells // *Blood.*—1992.—80.—P. 2454.
39. *Matsunaga T., Kato T., Miyazaki H., Ogawa M.* Throm-бopoietin promotes the survival of murine hematopoietic long-term reconstituting cells: comparison with the effects of FLT3/FLK-2 ligand and interleukin-6 // *Blood.*—1998.—92.—P. 452—461.
40. *Broxmeyer H. E.* Suppressor cytokines and regulation of myelopoiesis // *Amer. J. Ped. Hematol. and Oncol.*—1992.—14.—P. 22.
41. *Jacobsen S. E. M., Ruscetti F. W., Dubois C. M. et al.* Transplantation growth factor beta transmodulates the expres-sion of colony stimulating factor cell lines // *Blood.*—1991.—77.—P. 1706.
42. *Наман В. Г., Зуфф К. Ф.* Регуляция крове-творения // *Гематология и трансфузиология.*—1994.—2.—С. 3.
43. *D'Amore P. A.* Kissing cousins — evidence for a common vascular cell precursor // *Nature Medicine.*—2000.—6, N 12.—P. 1323—1324.
44. *Momina S., Johansson C. B., Frisen I.* Get to know your stem cells // *Curr. Opin. Neurobiol.*—2000.—10.—P. 45—49.
45. *Brüstle O., Spiro A. C., Karram S. K., Choudhary K., Okabe S., McKay R. D. G.* *In vitro*-generated neural precursors particpate in mammalian brain development // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1997.—94.—P. 14809—14814.
46. *Bain C., Kitchens D., Yao M., Gottlieb D. I.* Embrionic stem cells express neuronal properties *in vitro* // *Devel. Biol.*—1995.—168.—P. 342—357.
47. *Reves R. H., Yao J., Crowley M. R., Buck S., Zhang X., Yarowsky P., Gearhart J. D., Hilt D. C.* Astrocytosis and axonal proliferation in the hippocampus of S100b transgenic mice // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1994.—91.—P. 5359—5363.
48. *Ronfard V., Rives J.-M., Neveux Y., Carsin H., Barrandon Y.* Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns transplanted with autologous cultured epithelium grown on a fibrin matrix // *Transplantation.*—2000.—70, N 11.—P. 1588—1596.
49. *Pellegrini G., Ranno R., Stracuzzi G., Bondanza S., Guerra L., Zambruno G., Micali G., De Luca M.* The control of epidermal stem cells (holoclones) in the treatment of massive fullthickness burns with autologous keratinocytes cultured on fibrin // *Transplantation.*—1999.—68.—P. 868.
50. *Wilmut I., Schnieke A. E., McWhir J., Kind A. J., Campbell K. H. S. N ? V.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells // *Nature.*—1997.—385, N 6619.—P. 810.

УДК 576.5

Надійшла до редакції 12.06.2000