ВВЕДЕНИЕ В ПОНЯТИЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И РЕГЕНЕРАТИВНУЮ МЕДИЦИНУ

РЕЗЮМЕ

Стволовые клетки представляют собой популяцию недифференцированных клеток, характеризующихся способностью к экстенсивному размножению (самовосстановлению), обычно возникающим из одной клетки (клональные) и дифференцированным в разные типы клеток и тканей (потентные). Существует несколько источников стволовых клеток с различной активностью. Плюрипотентные клетки представляют собой эмбриональные стволовые клетки, полученные из внутренней клеточной массы эмбриона, а индуцированные плюрипотентные клетки образуются после перепрограммирования соматических клеток. Плюрипотентные клетки могут дифференцироваться в ткани из всех 3 зародышевых листков (энтодермы, мезодермы и эктодермы). Мультипотентные стволовые клетки могут дифференцироваться в ткани, происходящие из одного зародышевого листка, такие как мезенхимальные стволовые клетки, которые образуют жировую ткань, кости и хрящи. Тканерезидентные стволовые клетки являются олигопотентными, поскольку они могут образовывать терминально дифференцированные клетки конкретной ткани. Стволовые клетки можно использовать в клеточной терапии для замены поврежденных клеток или для регенерации органов. Кроме того, стволовые клетки расширили наше понимание развития, а также патогенеза заболеваний. Клеточные линии, специфичные для заболевания, также можно размножать и использовать при разработке лекарств. Несмотря на значительный прогресс в биологии стволовых клеток, такие вопросы, как этические споры в отношении эмбриональных стволовых клеток, образование опухолей и отторжение, ограничивают их полезность. Однако многие из этих ограничений обходят, и это может привести к значительным достижениям в лечении заболеваний. Этот обзор представляет собой введение в мир стволовых клеток и обсуждает их определение, происхождение и классификацию.

ВВЕДЕНИЕ

Стволовые клетки представляют собой недифференцированные клетки, которые присутствуют на стадиях эмбриональной, фетальной и взрослой жизни и дают начало дифференцированным клеткам, которые являются строительными блоками тканей и органов. На постнатальном и взрослом этапах жизни тканеспецифичные стволовые клетки обнаруживаются в дифференцированных органах и играют важную роль в восстановлении после повреждения органа. Основными характеристиками стволовых клеток являются: (а) самообновление (способность к экстенсивному размножению), (б)клональность (обычно возникающая из одной клетки) и (в) активность (способность дифференцироваться в разные типы клеток). Эти свойства могут различаться у различных стволовых клеток. Например, эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), полученные из бластоцисты, обладают большей способностью к самообновлению и потенции, в то время как стволовые клетки, обнаруженные во взрослой ткани, имеют ограниченное самообновление, поскольку они не будут активно размножаться и могут дифференцироваться только в тканеспецифические клетки.



Рис.1. Иерархия стволовых клеток. Тотипотентные клетки образуют эмбриональную и экстраэмбриональную ткани. Плюрипотентные клетки образуют все 3 зародышевых листка, в то время как мультипотентные клетки генерируют клетки, ограниченные одним зародышевым листком. Клетки соединения бронхоальвеолярных протоков в легких могут быть мультипотентными, в то время как пневмоциты типа II являются олигопотентными и дифференцируются в пневмоциты типа I альвеол.

Организм человека развивается из зиготы и бластоцисты, из которых происходят ЭСК, в зародышевые листки энтодермы, мезодермы и эктодермы. Специфические органы возникают из зародышевых листков. Некоторые из клеток-предшественников, которые участвовали в формировании органов, окончательно не дифференцируются, но сохраняются в виде тканевых стволовых клеток и могут быть обнаружены в костном мозге, костях, крови, мышцах, печени, головном мозге, жировой ткани, коже и желудочно-кишечном тракте [1, 2]. Тканевые стволовые клетки можно назвать клетками-предшественниками, поскольку они дают терминально дифференцированные и специализированные клетки ткани или органы. Эти клетки могут находиться в спящем состоянии в тканях, но будут размножаться в условиях повреждения и восстановления [3-5]. Динамика тканевых стволовых клеток или клеток-предшественников варьируется от ткани к ткани; например, в костном мозге, печени, легких и кишечнике стволовые клетки регулярно пролиферируют в дополнение к клеткам во время нормального обновления или повреждения [6-9], в то время как в поджелудочной железе, сердце или нервной системе они пролиферируют для замены поврежденных клеток после травмы [10-14].

Идея заживления ран и регенерации органов так же стара, как человечество, и отражена в древнегреческом мифе о Прометее, греческом титане, наказанном Зевсом за его неповиновение в том, что он дал людям огонь и знание. В этом мифе Прометей привязан к скале, и каждый день орел съедает часть его печени, которая затем регенерирует. В современной медицине работа со стволовыми клетками и регенерацией органов началась с первых попыток трансплантации костного мозга на животных моделях в 1950-х годах. Эти новаторские исследования проложили путь к трансплантации костного мозга человека [15], терапии, широко используемой в настоящее время при различных заболеваниях крови [16]. Эта новая терапевтическая стратегия выявила существование стволовых клеток, регенерирующих ткани взрослого организма [17]. В настоящее время регенеративная медицина является основным направлением исследований не только для поиска методов лечения, но и для понимания базовой биологии и патогенеза заболеваний [18-20]. Хотя при исследованиях стволовых клеток возникает ряд этических вопросов [21], последние достижения в области выделения и развития стволовых клеток помогли ученым идентифицировать и культивировать определенные типы клеток для регенерации тканей при различных заболеваниях, таких как болезнь Паркинсона [22], болезнь Альцгеймера [22,23], или заболевания сердца [24], мышц [25], легких [26, 27], печени [28] и других органов [14].

КЛАССИФИКАЦИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ОСНОВЕ ПОТЕНЦИАЛА ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Способность к дифференцировке, одна из двух основных характеристик стволовых клеток, различается между стволовыми клетками в зависимости от их происхождения и происхождения (рис. 1). Все стволовые клетки можно разделить в соответствии с их потенциалом дифференцировки на 5 групп: тотипотентные или омнипотентные, плюрипотентные, мультипотентные, олигопотентные и унипотентные (таблица 1) [29].

Таблица 1. Классификация стволовых клеток по их потенциалу дифференцировки и происхождению

|  |  |
| --- | --- |
| Дифференциальный потенциал | Источник |
| Тотипотент  |  |
| Плюрипотентный | ЭСК, ИСПК |
| Мультипотентный | Фетальные СК |
| Олигопотентный | Взрослые или соматические СК |
| Унипотентный |  |

*Тотипотентные клетки*

Тотипотентные или омнипотентные клетки являются наиболее недифференцирован­ными клетками и обнаруживаются в раннем развитии. Оплодотворенный ооцит и клетки первых двух делений являются тотипотентными клетками, поскольку они дифференцируются как в эмбриональные, так и во внеэмбриональные ткани, формируя тем самым эмбрион и плаценту [30].

*Плюрипотентные клетки*

Плюрипотентные стволовые клетки способны дифференцироваться в клетки, возникающие из 3-х зародышевых слоев – эктодермы, энтодермы и мезодермы, из которых развиваются все ткани и органы [31]. Плюрипотентные стволовые клетки, называемые ЭСК, впервые были получены из внутренней клеточной массы бластоцисты [32]. Недавно Takahashi и Yamanaka [33] создали плюрипотентные клетки путем перепрограммирования соматических клеток. Эти клетки называются индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПСК) и имеют сходные характеристики с ЭСК. Примечательно, что не было выделено ни одной популяции плюрипотентных клеток из легкого.

*Мультипотентные клетки*

Мультипотентные стволовые клетки обнаруживаются в большинстве тканей и дифференцируются в клетки из одного зародышевого листка [34]. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) являются наиболее известными мультипотентными клетками. Они могут быть получены из различных тканей, включая костный мозг, жировую ткань, кость, желе Вартона, пуповинную кровь и периферическую кровь [35]. МСК прикрепляются к чашкам для культивирования клеток и характеризуются специфическими поверхностными клеточными маркерами. Эти клетки могут дифференцироваться в ткани мезодермы, такие как жировая ткань, кости, хрящи и мышцы [35-38]. Недавно МСК были дифференцированы в нейрональную ткань, происходящую из эктодермы. Это пример трансдифференцировки, т.е. когда клетка из одного зародышевого листка (мезодермы) дифференцируется в нейрональную ткань (эктодерму) [39]. Резидентные МСК были выделены из легких; однако на сегодняшний день не было выделено ни одной другой мультипотентной клетки [40].

*Олигопотентные клетки*

Олигопотентные стволовые клетки способны самообновляться и образовывать 2 или более клонов в конкретной ткани; например, сообщалось, что глазная поверхность свиньи, включая роговицу, содержит олигопотентные стволовые клетки, которые генерируют отдельные колонии клеток роговицы и конъюнктивы [41]. Гемопоэтические стволовые клетки являются типичным примером олигопотентных стволовых клеток, поскольку они могут дифференцироваться как в миелоидные, так и в лимфоидные линии [42]. В легких исследования предполагают, что соединительные клетки бронхоальвеолярных протоков могут давать начало бронхиолярному эпителию и альвеолярному эпителию [43].

*Унипотентные клетки*

Унипотентные стволовые клетки могут самообновляться и дифференцироваться только в один специфический тип клеток и образовывать единую линию, такую ​​как мышечные стволовые клетки, давая начало зрелым мышечным клеткам, а не каким-либо другим клеткам [44-47]. В легких пневмоциты II типа альвеол дают начало пневмоцитам I типа.

КЛАССИФИКАЦИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПО ПРОИСХОЖДЕНИЮ

Стволовые клетки можно разделить на 4 широкие категории в зависимости от их происхождения: ЭСК, фетальные и взрослые стволовые клетки и иПСК (таблица 1) [48, 49]. В целом, ЭСК и иПСК являются плюрипотентными, тогда как взрослые стволовые клетки являются олигопотентными или унипотентными.

*Эмбриональные стволовые клетки*

ЭСК плюрипотентны, происходят из внутренней клеточной массы бластоцисты, стадии преимплантационного эмбриона, через 5-6 дней после оплодотворения [32]. Эти клетки могут дифференцироваться в ткани 3 первичных зародышевых листков, но также могут сохраняться в недифференцированном состоянии в течение длительного периода в культуре [50]. Бластоциста имеет 2 слоя клеток, то есть внутреннюю клеточную массу, которая сформирует эмбрион, и внешнюю клеточную массу, называемую трофобластами, которая сформирует плаценту. Клетки внутреннего клеточного слоя отделяют от трофобластов и переносят в чашку для культивирования в очень специфических условиях для получения линий ЭСК [51]. ЭСК идентифицируют по наличию транскрипционных факторов, таких как Nanog и Oct4 [52,53]. Эти факторы поддерживают стволовые клетки в недифференцированном состоянии, способном к самообновлению [53, 54]. ЭСК, культивированные в недифференцированном состоянии без генетических аномалий, размножают как линию ЭСК. Эти клетки можно было замораживать и размораживать для дальнейшего культивирования и экспериментов [55]. Условия культивирования имеют решающее значение для поддержания ЭСК в недифференцированном состоянии. Используют фидерный слой эмбриональных фибробластных клеток (MEFC) или среду, содержащую антидифференцирующий цитокиновый ингибирующий фактор лейкемии (ИФЛ). Удаление ИФЛ из среды или удаление ЭСК из фидерного слоя приводит к образованию «зародышевых тел», в которых присутствуют все 3 зародышевых листка (энтодерма, мезодерма и эктодерма) [56-60].

*Взрослые стволовые клетки*

Взрослые стволовые клетки получают из тканей взрослых. Примеры включают МСК, а также стволовые клетки, полученные из плацентарной ткани, такие как эпителиальные клетки амниона человека. Было показано, что эти клетки обладают противовоспалительным действием и способствуют восстановлению моделей повреждений на животных. Они имеют ограниченную способность к дифференцировке, хотя эти клетки были дифференцированы в ткани из различных слоев зародышевых клеток in vitro [61,62].

Взрослые стволовые клетки имеют преимущество, поскольку аутологичные клетки не вызывают проблем отторжения или этических споров [21,63]. Взрослые стволовые клетки могут быть получены из всех тканей 3-х зародышевых листков, а также из плаценты. Несколько исследований продемонстрировали, что трансплантация взрослых стволовых клеток восстанавливает поврежденные органы in vivo, такие как репарация костной ткани и реваскуляризация ишемизированной сердечной ткани посредством дифференцировки стволовых клеток и образования новых специализированных клеток [64-66]. Другие исследования показали, что культивируемые взрослые стволовые клетки секретируют различные молекулярные медиаторы с антиапоптотическими, иммуномодулирую­щими, ангиогенными и хемоаттрактант­ными свойствами, которые способствуют восстановлению [67, 68].

*Тканерезидентные стволовые клетки*

Способность некоторых тканей и органов у взрослых к обновлению и восстановлению после повреждения в решающей степени зависит от резидентных в тканях стволовых клеток, которые генерируют тканеспецифические, терминально дифференцированные клетки [69]. Исследования предполагают, что эти клетки возникают во время онтогенеза и остаются в состоянии покоя до тех пор, пока локальные стимулы не активируют их пролиферацию, дифференцировку или миграцию [70, 71].

Резидентные в тканях стволовые клетки находятся в «нише стволовых клеток» [72]. Ниша стволовых клеток представляет собой микроокружение, которое контролирует самообновление и дифференцировку этих клеток [73]. Появляется все больше доказательств того, что на функцию стволовых клеток критически влияют внешние сигналы из микроокружения; следовательно, ниша играет решающую роль в гомеостазе стволовых клеток и восстановлении тканей [74-76]. Большинство резидентных в тканях стволовых клеток находятся в состоянии покоя, но активируются специфическими сигналами во время повреждения и восстановления [73]. Этот покой резидентных в тканях стволовых клеток не совсем понятен, но, вероятно, на него влияет среда ниши. Это свойство имеет решающее значение для поддержания популяции клеток, которые не выполняют других функций, кроме образования тканеспецифических клеток во время восстановления [77]. Окружение ниши состоит из различных сигналов от внеклеточного матрикса и растворимых медиаторов, которые опосредуют клеточную передачу сигналов и экспрессию генов [78-81], тем самым регулируя пролиферацию, миграцию, дифференцировку или апоптоз стволовых клеток [82, 83]. Нам все еще необходимо выяснить, что является триггером для перехода стволовых клеток от состояния самообновления и пролиферации к дифференцировке, и являются ли эти сигналы тканеспецифичными. Кроме того, типы клеточного деления, которому подвергается стволовая клетка, определяют клетки, которые генерирует тип клеток. Симметричное клеточное деление стволовой клеткой приводит к идентичным дочерним клеткам, что дает новые клетки для восстановления поврежденных клеток после повреждения [84, 85] (рис. 2). Важно отметить, что неконтролируемое увеличение пролиферации стволовых клеток может привести к гиперплазии стволовых клеток и/или канцерогенезу, в то время как снижение количества стволовых клеток может нарушить восстановление органов; таким образом, баланс в гомеостазе стволовых клеток очень важен [86].

Асимметричное деление происходит, когда стволовая клетка генерирует идентичную дочернюю клетку и вторую дифференцированную дочернюю клетку. Этот процесс обеспечивает восстановление и регенерацию органов при сохранении популяции стволовых клеток [87-89].

*Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки*

ИПСК производятся из взрослых соматических клеток, которые генетически перепрограммированы в «ESC-подобное состояние» [90]. ИПСК мышей впервые были описаны Takahashi и Yamanaka [33] в 2006 г. путем трансдукции мышиных фибробластов с 4 генами, кодирующими следующие факторы транскрипции: октамер-связывающий транскрипционный фактор 3/4 (OCT3/4), SRY-связанный высокомобильный блок-белок группы-2 (SOX2), онкопротеин c-MYC и фактор Круппеля-подобный 4 (KLF4). Год спустя, в 2007 г., Яманака и его коллеги [91] описали получение ИПСК человека из дермальных фибробластов взрослого человека с теми же 4 факторами: Oct3/4, Sox2, Klf4 и c-Myc. Они продемонстрировали, что эти клетки были сходны с ЭСК человека с точки зрения морфологии, пролиферации, поверхностных антигенов, экспрессии генов, эпигенетического статуса плюрипотентных генов, специфичных для клеток, и активности теломеразы, и они могли дифференцироваться в типы клеток 3 зародышевых листков in vitro. [91]. ИПСК в настоящее время являются полезными инструментами для разработки лекарств, моделирования заболеваний и регенеративной медицины, но хотя эти клетки обладают идентичными характеристиками плюрипотентных стволовых клеток [92], пока неизвестно, будут ли ИПСК и ЭСК существенно различаться в клинической практике.

Ретровирусные векторы, используемые для введения факторов репрограммирования во взрослые клетки, и онкогены, такие как c-Myc, ограничивают использование ИПСК в клинических исследованиях, поскольку векторы, используемые для введения факторов транскрипции во взрослые клетки, могут вызывать рак [93]. В настоящее время исследователи изучают новые методы создания безопасных ИПСК без геномных манипуляций [94]. Описаны новые методы с использованием нескольких типов соматических клеток взрослых мышей и человека. Чтобы избежать использования онкобелков c-MYC и KLF4, они использовали один фактор (OCT3/4 или KLF4) или заменяли их комбинациями других факторов [95, 96], включая использование неретровирусных векторных подходов, таких как как химические соединения, плазмиды, аденовирусы и транспозоны [97-100].

Несмотря на проблемы с безопасностью, это инновационное открытие создало мощный инструмент для перепрограммирования соматических клеток взрослого организма, «отправляя их обратно» на более ранние недифференцированные стадии и генерируя ИПСК, тем самым создавая идентичное соответствие клеткам-донорам и, таким образом, избегая проблем отторжения.



Рис. 2. Стволовые клетки характеризуются способностью к самообновлению и дифференцировке. Каждая отдельная дочерняя клетка может пойти дальше в симметричном делении, давая больше стволовых клеток, или дифференцироваться в одну или несколько специализированных клеток, в зависимости от плюрипотентности стволовой клетки, поддерживая популяцию тканевых клеток.

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ И РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ

Вклад стволовых клеток в современную медицину имеет первостепенное значение как из-за их широкого использования в фундаментальных исследованиях, так и из-за возможностей, которые они дают нам для разработки новых терапевтических стратегий в клинической практике [101]. Их характеристики делают их ценными для широкого круга приложений в биологических и медицинских науках [18]. Например, ЭСК являются отличными инструментами для понимания человеческого развития и органогенеза. Стволовые клетки, такие как ИПСК, будут иметь решающее значение в исследовании новых и безопасных методов лечения.

Кроме того, стволовые клетки могут заменить поврежденную ткань или даже регенерировать органы [14]. ИПСК дают возможность создавать модели болезней человека, которые улучшат понимание патогенетических механизмов заболеваний человека и позволят улучшить клеточную терапию дегенеративных заболеваний [18].

Клеточная терапия была исследована почти при каждом дегенеративном заболевании. Обнадеживающие результаты доклинических исследований и клинических испытаний уже были описаны при нескольких заболеваниях, таких как сахарный диабет [102, 103], хронический миелоидный лейкоз [104, 105], цирроз печени [106, 107], легочный фиброз [108, 109], Болезнь Крона [110, 111], сердечная недостаточность [ 66 , 112 ] и расстройства нервной системы [113, 114, 115, 116, 117], а иммуномодулирующие эффекты стволовых клеток нашли свое применение при ряде состояний, характеризующихся преимущественным воспалением [118, 119].

ВЫВОДЫ

Есть вопросы, которые необходимо учитывать в клеточной терапии и регенеративной медицине. Иммуноотторже­ние все еще рассматривается, хотя МСК и плацентарная ткань, а также ИПСК решают эту проблему. Генетическая стабильность стволовых клеток, особенно ИПСК, еще предстоит выяснить. Генетическая нестабильность может привести к образованию опухоли. Действительно, пластичность и самообновление, которые характеризуют стволовые клетки, могут привести к канцерогенезу в ткани хозяина [120], в то время как спонтанно возникающие тератомы и родственные опухоли могут развиваться при использовании ЭСК или ИПСК при терапевтической клеточной трансплантации [121]. Наконец, возник ряд этических проблем, связанных главным образом с использованием ЭСК [122]. К ним относятся этические споры об уничтожении эмбриона при создании ЭСК. Теперь это потенциально можно обойти с помощью ИПСК.