

Біотехнологічні аспекти використання мезенхімальних, ембріональних, стромальних та індукованих плюрипотентних стовбурових клітин

М. В. Шульга^{1,2}, Я. М. Царівська²

<https://doi.org/10.31174/SEND-NT2018-157VI17-08>

1. Медична компанія ilaya^R

2. Київський національний університет імені Тараса Шевченка «Інститут високих технологій»

Corresponding author. E-mail: mary.lytvynko@gmail.com

Paper received 25.01.18; Accepted for publication 30.01.18.

Анотація. Стаття присвячена з'ясуванню основних типів стовбурових клітин (мезенхімальних, ембріональних, постнатальних, індукованих плюрипотентних) та біотехнологічних аспектів їхнього використання. Результати дослідження показали, що стовбурові клітини здатні до диференціювання в такі типи тканин, як: хрящова, м'язова, кісткова, володіють самовідновлювальними властивостями та мають проліферативні ознаки. Дослідження останніх років в галузі біотехнології довели, що ембріональні, стромальні та індуковані плюрипотентні стовбурові клітини є джерелом застосування для клітинної терапії та регенеративної медицини.

Ключові слова: стовбурові клітини, мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), ембріональні стовбурові клітини (ЕСК), індуковані стовбурові клітини, індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (iPS).

Вступ. Одним із актуальних питань сучасних біотехнологічних досліджень є вивчення різних типів стовбурових клітин, що відкриває значні перспективи для лікування важких невиліковних захворювань, таких як діабет, захворювання серцево-судинної системи, нейродегенеративні захворювання тощо [8; 13]. Перше повідомлення про наявність стовбурових клітин було доведено до наукової спільноти російським вченим-гістологом О. О. Максимовим, який у 1908 році ввів у науковий обіг термін «стовбурова клітина» для пояснення механізму швидкого самовідновлення клітин крові. Пізніше російський професор О. Я. Фріденштейн підтвердив здогадки колеги, і вивчаючи потенційні можливості цих клітин, став розробляти методи практичного застосування стовбурових клітин ще на початку 1950-х років. Саме тоді було доведено, що за допомогою трансплантації кісткового мозку (основного джерела стовбурових клітин) можна врятувати тварин, що отримали смертельну дозу радіоактивного опромінення. О. Я. Фріденштейн і його співробітники вперше показали, що в кістковому мозку, крім гемопоетичних, є стромальні стовбурові клітини, які при культивуванні формували колонії фібробластоподібних клітин. Ці наукові розвідки дали поштовх подальшому вивченню стовбурових клітин.

Короткий огляд публікацій з теми. Дослідження стовбурових клітин людини інтенсифікувалося у шістдесятих роках ХХ століття з відкриття канадських учених Ернеста МакКалока та Джеймса Тілла, які наочно продемонстрували наявність цих клітин, основною властивістю яких є здатність прикріплюватися до субстрату (пластик, скло), проліферувати за умов моношарового культивування. У дослідженнях С. Казухіро, М. Оуена та їхніх колег [7; 13;] дана властивість отримала назву «колонієутворюючі одиниці фібробластів» (КУОф). Стовбурові стромальні клітини (ССК), іноді їх ще називають мезенхімальними стовбуровими клітинами (МСК), за походженням, або остеогенні клітини — попередники кісткового мозку є джерелом поповнення остеобластів — клітин, які будують кісткову тканину. Їх властивості вивчають методом клонування *in vitro* [7; 15]. У культурах остеогенні клітини-попередники утворюють колонії —

клони, від чого і походить їх назва — колонієутворюючі одиниці фібробластів (КУОф). Згодом великі зусилля дослідників [5; 11; 16] були спрямовані на розшифровку молекулярних механізмів, що регулюють пластичність дорослих стовбурових клітин, і розробку шляхів їх використання з терапевтичними намірами. Упорядкований ланцюг високорегульованих процесів, що містить проліферацію, міграцію, диференціювання та дозрівання клітин, призводить до виробництва та підтримки більшості клітинних ліній у дорослому організмі. Найбільш ранній тип клітин у цьому ланцюзі був названий стовбуровою клітиною [3, 13].

Проблема дослідження стовбурових клітин перебуває в центрі уваги сучасних учених [14; 18; 21], оскільки саме вони мають високий потенціал для розвитку в різних типах клітин в організмі людини чи тварини під час раннього життя та росту. Крім того, як зазначається у низці праць [4; 5; 12; 13], у багатьох тканинах стовбурові клітини слугують своєрідною внутрішньою системою ремонту, що ділиться суттєво без обмежень на поповнення інших клітин, поки людина або тварина все ще живі. Коли стовбурові клітини діляться, кожна нова клітина має потенціал залишитися стовбуровою клітиною або стати іншим типом клітини з більш спеціалізованою функцією, такою як нервова, м'язова, червоним кістковим мозком або клітиною головного мозку. Відтак усі стовбурові клітини можуть самовідновлюватися, тобто робити копії самих себе і диференціюватися, а саме, розвиватися в більш спеціалізовані клітини.

Оскільки стовбурові клітини є основою для кожного органу та тканини у людському тілі, то існує багато різних типів стовбурових клітин, які надходять з різних місць тіла або формуються в різний час онтогенезу. До них відносяться ембріональні стовбурові клітини, які існують лише на ранніх стадіях розвитку та різних типах тканин — специфічних (або дорослих) стовбурових клітин, які з'являються під час розвитку плоду і залишаються в організмі протягом усього життя [4; 8; 19]. Більшість учених займаються вивченням тих чи інших видів стовбурових клітин [3; 6; 10; 12; 15], проте, деякі науковці, зокрема Р. М. Нерем, Б. Реубінофф з колегами [12; 15], вико-

ристовують у своїх дослідженнях усі види стовбурових клітин, що розширює можливості вивчення їхніх біотехнологічних властивостей.

Мета дослідження: з'ясування типів стовбурових клітин та вивчення біотехнологічних властивостей стовбурових клітин.

Матеріали та методи: Під час дослідження використано низку наукових публікацій з проблематики наукової розвідки, матеріали періодичних видань, Інтернет-ресурси. У роботі сформовано комплексну методiku дослідження, яка ґрунтується на загальних положеннях і методах системного аналізу. Аналітичний опис біотехнологічних аспектів використання мезенхімальних, ембріональних, стромальних та індукованих плюрипотентних стовбурових клітин базується на методах морфологічного аналізу й синтезу систем з використанням елементів загальнонаукових (абстрагування, узагальнення, формалізація) та емпірико-теоретичних (аналіз, синтез, порівняння, ідеалізація) методів.

Результати дослідження: Природно, що ембріональні стовбурові клітини виділяються з ембріону. Зокрема, ембріональні стовбурові клітини виділяються з ембріонів, які розвинулися з заплідненої *in vitro* яйцеклітини у спеціалізованих клініках штучного запліднення, і які передаються для наукових досліджень за згодою донорів. Вперше ізоляція ембріональних стовбурових клітин від бластоцитів людини була документально запроцьогольована в 1994 році [1]. З того часу методики виведення та культивування людських ембріональних клітин були уточнені [14; 19]. Здатність виділяти людські ембріональні клітини з бластоцист та вирощувати їх у культурі значною мірою залежить від цілісності та стану бластоцисти, з якої виведені клітини. Ембріональні стовбурові клітини отримуються, головним чином, у вигляді порожнистої кульки із внутрішньої клітинної маси бластоцистів, які у людини формуються через три-п'ять днів після запліднення яйцеклітини спермою. Бластоциста людини є приблизно розміром з крапку над літерою "і". При нормальному розвитку клітини всередині внутрішньої клітинної маси породжують більш спеціалізовані клітини, які породжують все тіло — всі наші тканини та органи [8]. Проте, коли вчені виділяють внутрішню клітинну масу і вирощують ці клітини в спеціальних лабораторних умовах, вони зберігають властивості ембріональних стовбурових клітин [9].

Ембріональні стовбурові клітини є плюрипотентними, тобто вони можуть породжувати кожен тип клітин у повністю утвореному тілі, окрім плаценти і пуповини [17; 18; 21]. Особливою рисою цих клітин є те, що вони не експресують HLA (human leucocyte antigens), тобто не виробляють антигени тканинної сумісності. Це дає можливість трансплантувати їх з низьким ризиком відторгнення. Ці клітини є неймовірно цінними, оскільки вони забезпечують відновлюваний ресурс для вивчення захворювань та розвитку, а також для тестування ліків та інших методів лікування.

Вчені тільки починають розуміти біологію ембріональних стовбурових клітин людини [15; 18] і багато ключових питань залишаються без відповіді або частково вивчені. Наприклад, для вдосконалення схеми

культивування ембріональних клітин важливо, щоб вчені ідентифікували механізми, які дозволяють людським ембріональним клітинам *in vitro* розмножуватися без диференціації [13].

Також зауважимо, що найважливішим недоліком ембріональних стовбурових клітин є неможливе автологічне використання при трансплантації, оскільки виділення цих клітин несумісне з його розвитком в онтогенезі [7].

Розглядаючи властивості стромальних стовбурових клітин, передусім зазначимо, що це мультипотентні стовбурові клітини дорослого організму, що утворюють строму кісткового мозку і мають мезенхімальне походження. Перші МСК були виявлені в кістковому мозку і було доведено, що вони здатні диференціюватися у кісткові, хрящові та жирові клітини [5]. Створено лінії людських мезенхімальних стовбурових клітин, які можуть диференціюватися в різні тканинні клітини, включаючи кістки, нервові клітини. У зв'язку з цим потрібно підкреслити, що стромальні клітини кісткового мозку здатні підтримувати зростання гемопоетичних стовбурових клітин і так званих "стромальних пухлинних клітин", змішаних з пухлинними клітинами. У науковій літературі є повідомлення про те, що локальна трансплантація стромальних стовбурових клітин кісткового мозку сприяє ефективній корекції кісткових дефектів, причому відновлення кісткової тканини в цьому випадку протікає інтенсивніше, ніж при спонтанній репаративній регенерації [6; 12].

Додамо також, що постнатальні клітини дорослого організму мають меншу потентність, порівняно з ембріональними стовбуровими клітинами, що значно підвищує рівень їх застосування в клітинній терапії. Незважаючи на значні досягнення науковців у дослідженні постнатальних дорослих стовбурових клітин людини протягом останніх десяти років, їх природна активність *in vivo* є ще недостатньо зрозумілою.

Одним з найбільш перспективних типів стовбурових клітин для клітинної терапії є, безперечно, мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), які визначаються в основному функціональним аналізом, використовуючи культивовані клітини. Впровадження МСК *in vitro* ускладнює їх вивчення, оскільки штучні умови можуть вводити експериментальні артефакти. МСК залучені в процеси клітинної виживаності, міграції та взаємодії з позаклітинним матриксом [10; 19]. З практичної точки зору, вченими неодноразово відзначався позитивний ефект уведення суспензії стовбурових клітин онкологічним хворим. Це проявлялося і у зменшенні розмірів пухлини або розсмоктуванні дрібних метастазів, і в швидкому відновленні повноцінного кровотворення та, як наслідок, поліпшенні загального стану хворого [11].

Крім того, трансплантація мезенхімальних стовбурових клітин може використовуватися для відновлення стромі кісткового мозку в онкологічних хворих після радіо- та хіміотерапії, а в поєднанні з клітинами кісткового мозку – для відновлення гемопоезу. Однак широке застосування МСК у медичній практиці не можливе без ґрунтового вивчення онкогенного потенціалу стовбурових клітин. Так, японські вчені

довели, що стовбурові клітини кісткового мозку мають потенційну онкогенну активність [7].

Мультипотентні стовбурові клітини (МСК) стабілізують кровоносні судини і сприяють гомеостазу тканин та імунної системи в фізіологічних умовах і беруть на себе більш активну роль у відновленні пошкодження вогнища тканини [12]. Ці властивості пов'язують МСК з імунною та судинною системами, підкреслюючи таким чином роль МСК як фізіологічного інтегратора та їх важливість для відновлення репарації тканин [10].

У контексті розгляду індукованих плюрипотентних стовбурових клітин маємо зазначити, що саме за це новаторське відкриття японський дослідник, професор Інституту передових медичних наук в Кіотському університеті Сін'я Яманака (разом з Джоном Гердоном) отримав Нобелівську премію з фізіології та медицини 2012 року за праці в галузі біології розвитку та отримання індукованих стовбурових клітин. Він знайшов новий спосіб перепрограмувати дорослі спеціалізовані клітини, щоб перетворити їх у стовбурові клітини. Ці лабораторно вирощені стовбурові клітини є плюрипотентними – вони можуть диференціюватися в будь-який тип клітини в організмі – і називаються індукованими плюрипотентними стовбуровими клітинами або клітинами іPS. Тільки ембріональні стовбурові клітини є природньо плюрипотентними. Відкриття С. Яманаки означає, що теоретично будь-яка клітина тіла тепер може бути перетворена на плюрипотентну стовбурову клітину [18].

Необхідно зацентувати увагу на тому, що клітини іPS та ембріональні стовбурові клітини дуже схожі. Вони самовдосконалюються, тобто вони можуть розподіляти і створювати копії себе нескінченно. Обидва типи стовбурових клітин можуть бути використані, як наголошують у своєму дослідженні М. Штадтфелдт та його однодумці, для виведення практично будь-яких спеціалізованих клітин у точно контрольованих умовах в лабораторії [16]. Як іPS-клітини, так і ембріональні стовбурові клітини можуть допомогти зрозуміти, як розвиваються спеціалізовані клітини із плюрипотентних клітин.

У той же час, на відміну від ембріональних стовбурових клітин, створення клітин іPS не залежить від використання клітин раннього ембріона. Чи існують інші відмінності? Сучасні дослідження показують, що деякі гени в клітинах іPS поведуться інакше, ніж у ембріональних стовбурових клітин [18; 21]. Це пов'язано з неповним перепрограмуванням клітин та / або генетичними змінами, отриманими клітинами іPS, коли вони ростуть і розмножуються. Учені [8; 20; 21] детально вивчають ці питання, щоб з'ясувати, яким чином такі розбіжності можуть впливати на викори-

стання клітин у фундаментальних дослідженнях та у клінічних програмах. У зв'язку з цим зауважимо, що більше досліджень також потрібно, щоб зрозуміти, як працює перепрограмування всередині клітини. Отже, на сьогодні багато вчених вважають, що в основних дослідженнях ми не можемо замінити ембріональні стовбурові клітини на клітини іPS [20].

Безперечно, важливим кроком у розробці клітинної терапії для будь-якої хвороби є точне розуміння того, як працює хвороба: що саме відбувається в людському організмі. Для цього дослідники повинні вивчити клітини чи тканини, що постраждали від хвороби, але це не завжди так просто. Наприклад, практично неможливо отримати справжні клітини мозку у пацієнтів з хворобою Паркінсона, особливо на ранніх стадіях захворювання, перш ніж пацієнт усвідомлює будь-які симптоми. Перепрограмування означає, що вчені тепер можуть отримати доступ до значної кількості конкретного типу нейронів (клітин головного мозку), які страждають від хвороби Паркінсона. Дослідники [16] вперше виділяють індуковані плюрипотентні клітини, взявши, наприклад, біопсію шкіри пацієнтів з хворобою Паркінсона. Тоді вони використовують ці клітини іPS для виробництва нейронів у лабораторії [16]. Нейрони мають один і той же генетичний склад, що і власні клітини пацієнтів. Таким чином, вчений може безпосередньо працювати з нейронами, які постраждали від хвороби Паркінсона, в штучних умовах. Отже, можна використовувати ці клітини, щоб дізнатись більше про те, що відбувається всередині івскласти схему лікування даного захворювання. Дана модель «клінічних захворювань» дає можливість нового терапевтичного пошуку або для захисту пацієнтів з різними видами захворювань [17; 18].

Висновки. Таким чином, із викладеного вище можна зробити висновок, що ембріональні, постнатальні, мезенхімальні, індуковані плюрипотентні стовбурові клітини займають центральне місце в кровотвірній системі, відповідають за сталу підтримку гемопоезу, володіють високою тотипотентністю. Стовбурові клітини мають унікальні властивості диференціювання в різні типи тканин такі, як м'язова, хрящова, нервова. Мультипотентні стовбурові клітини стабілізують кровоносні судини і сприяють гомеостазу тканин та імунної системи в фізіологічних умовах і беруть на себе активнішу роль у відновленні пошкодження вогнища тканини. Проаналізовані та узагальнені в цьому огляді дані вказують на необхідність більш поглиблених біотехнологічних досліджень та застосування їх у галузі біотехнології та в регенеративній медицині.

ЛІТЕРАТУРА

1. Bongso, A., Fong, C.Y., Ng, S.C., and Ratnam, S. (1994). Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts // *Hum. Reprod.* 9, P. 2110–2117.
2. Catherine M. Kolf, Elizabeth Cho, Rocky S. Tuan Mesenchymal stromal cells. *Biology of adult mesenchymal stem cells: Regulation of niche, self-renewal and differentiation* // *Arthritis Res Ther.*, 2007. P. 200-204.
3. Cowan, C. A, Atienza, J, Melton, D. A, Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells // *Science*, 2005. P. 1369–1373.
4. Doss, M. X, Koehler, C. I, Gissel, C et al. Embryonic stem cells: A promising tool for cell replacement therapy // *J Cell Mol. Med.* 2004. P. 465–473.
5. Faye, H., Chen and Rocky, S. Tuan et al. Adult stem cells for cartilage tissue engineering and regeneration // *Arthritis Research & Therapy*, 2008. P. 161-170.

6. Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., and Middleton, J. (2007). Mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing.
7. Kazuhiro, S., Megumi, K., Enichi, M., Saeri, O., Takashi, H., Kaoru, S. Mesenchymal progenitors able to differentiate into osteogenic, chondrogenic, and / or adipogenic cells in vitro are present in most primary fibroblast-like cell populations // Stem Cell, 2007. P. 11–15.
8. Keller, G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine // Genes and development, 2005. 19, P. 1129–1155.
9. Liao, J., Cui, C., Chen, S., et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells // Cell Stem Cell, 2009. P. 11–15.
10. Lindolfo da Silva, Meirelles, A., Arnold, I., Caplan, B., Nance beyer Nardia. In search of the in vivo identity of Mesenchymal stem cells // Cell, 2008. P. 77–81.
11. Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution // Cell Stem Cell, 2007. P. 55–70.
12. Nerem, R. M. Cell-based therapies: From basic biology to replacement, repair, and regeneration // Biomaterials, 28, 2008. P. 5074–5077.
13. Odorico, J. S., Kaufman, D. S., and Thomson, J. A. Multilineage Differentiation from Human Embryonic Stem Cell Lines // Stem Cells, 19, 2001. P. 193–204.
14. Owen, M. E. Clonal analysis in vitro of osteogenic differentiation of marrow CFU // J. Cell Science, 87, 1987. P. 731–738.
15. Reubinoff, B.E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A., and Bongso, A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro // Natural Biotechnology 18, 2000. P. 399–404.
16. Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D. T., Hochedlinger, K. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. // Cell Stem Cell, 2008. P. 230–240.
17. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // Cell, 2007. P. 1–12.
18. Takahashi, K., Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // Cell, 2006. P. 663–676.
19. Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // Science, 1998. P. 1145–1147.
20. Verfaillie, C. M. Adult stem cells: Assessing the case for pluripotency // Trends Cell Biology, 2002. P. 502–508.
21. Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells // Science, 2007. P. 1917–1920.

Biotechnological aspects of the use of mesenchymal, embryonic, stromal and induced pluripotent stem cells

M. V. Shulha, Y. M. Tsarivskaya

Abstract. The article is devoted to the identification of the main types of stem cells (mesenchymal, embryonic, postnatal, induced pluripotent) and biotechnological aspects of their use. The results of the study have shown that stem cells are capable of differentiating into such types of tissues as: cartilage, muscle, bone, have self-repairing properties and have proliferative signs. Recent studies in the field of biotechnology have shown that embryonic, stromal and induced pluripotent stem cells are a source of use for cell therapy and regenerative medicine.

Keywords: stem cell, mesenchymal stem cells (MSC), embryonic stem cells (ES), induced pluripotent stem (iPS) cells, induced pluripotent's stem cells (iPS).

Биотехнологические аспекты использования мезенхимальных, эмбриональных, стромальных и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

М. В. Шульга, Я. Н. Царивская

Аннотация. В статье рассматриваются основные типы стволовых клеток (мезенхимальных, эмбриональных, постнатальных, индуцированных плюрипотентных) и биотехнологические аспекты их использования. Результаты исследования показали, что стволовые клетки способны к дифференцированию в такие типы тканей, как хрящевая, мышечная, костная, обладают самовосстанавливающимися свойствами и имеют пролиферативные признаки. Исследования последних лет в области биотехнологии показали, что эмбриональные, стромальные и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки являются источником применения для клеточной терапии и регенеративной медицины.

Ключевые слова: стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки (МСК), эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), индуцированные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPS).