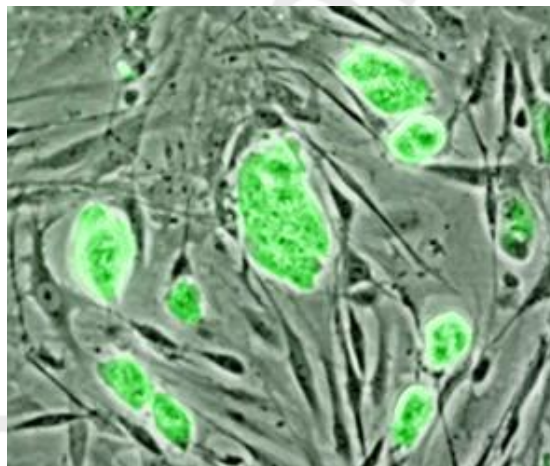


Н. И. МЕЗЕН, З. Б. КВАЧЕВА,  
Л. М. СЫЧИК

# СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ



Минск БГМУ 2014

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ  
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
КАФЕДРА БИОЛОГИИ

**Н. И. МЕЗЕН, З. Б. КВАЧЕВА, Л. М. СЫЧИК**

# **СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ**

Учебно-методическое пособие

2-е издание, дополненное



Минск БГМУ 2014

УДК 576.314.6/.7 (072.8)

ББК 28.05 я73

М44

Рекомендовано Научно-методическим советом университета в качестве учебно-методического пособия 30.10 2013 г., протокол № 2

Р е ц е н з е н т ы: д-р мед. наук Н. Н. Полещук; д-р мед. наук, проф. Б. А. Слука

**Мезен, Н. И.**

М44 Стволовые клетки : учеб.-метод. пособие / Н. И. Мезен, З. Б. Квачева, Л. М. Сычик. – 2-е изд., доп. – Минск : БГМУ, 2014. – 62 с.

ISBN 978-985-528-982-2.

Посвящено важным достижениям современной молекулярной и клеточной биологии. Дано понятие о стволовых клетках, освещена история открытия, изучения и применения стволовых клеток в медицине. Описана характеристика типов стволовых клеток, дана их классификация. Второе издание (первое вышло в 2008 году) дополнено информацией о создании банка пуповинной крови в Республике Беларусь. Расширен материал о маркерах идентификации стволовых клеток и о характеристике стволовых клеток взрослого организма. Подробно рассмотрены основные биологические свойства стволовых клеток, современные клеточные технологии и возможности их применения в различных областях медицины.

Предназначено для преподавателей, аспирантов, студентов 1-го курса всех факультетов, а также тем, кто интересуется вопросами изучения стволовых клеток.

УДК 576.314.6/.7 (072.8)

ББК 28.05 я73

ISBN 978-985-528-982-2

2014

© Мезен Н. И., Квачева З. Б., Сычик Л. М.,

© УО «Белорусский государственный  
медицинский университет, 2014

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ГСК** — гемопоэтические стволовые клетки
- ИЛ-3** — интерлейкин-3
- ИЛ-6** — интерлейкин-6
- ИПСК** — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки
- КВКМ** — клетки внутренней клеточной массы
- КСК** — кроветворные стволовые клетки
- КМ** — костный мозг
- КП** — клетки-предшественники
- ЛСК** — лейкозные стволовые клетки
- ММСК** — мультипотентные мезенхимные стромальные клетки
- РСК** — региональные стволовые клетки
- СК** — стволовые клетки
- ССК** — стромальные стволовые клетки
- СПК** — стволовые прогениторные клетки
- ЭСК** — эмбриональные стволовые клетки
- LIF** (Leucemia Inhibitory Factor) — лейкоемийный ингибиторный фактор
- SSEAs** (stage specific embryonic antigens) — специфический эмбриональный антиген

## ПОНЯТИЕ О СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ

Конец XX в. ознаменовался крупными достижениями молекулярной и клеточной биологии, которые создали предпосылки для применения принципиально новых эффективных технологий при лечении различных заболеваний. Успешная разработка методов выделения и длительного культивирования стволовых клеток (СК) открыли широкие перспективы для применения их в медицине. Последние достижения современной биотехнологии и генной инженерии готовят мировую науку врачевания к величайшему прорыву в истории: посредством пересадки СК излечивать тяжелейшие недуги.

Клетки нашего организма в основной массе *специализированы*, т. е. соответствуют и определяют специфические функции органов и тканей и в свою очередь определяются этими функциями. Всего в человеческом организме более 200 типов специализированных клеток. На самых ранних стадиях развития эмбриона клетки *не специализированы* (рис. 1). Они получили название *стволовых*, так как расположены в основании воображаемого *ствола* генеалогического дерева клеток, которое венчает крона из различных специализированных клеток (рис. 2).

*В стволе взрослого дерева существует очень небольшое количество СК, которые в обычных условиях во взрослом организме не делятся. Коммитированное потомство СК (клетки-предшественники) соматических тканей аналогично ветвям дерева: более многочисленно и обладает разной степенью детерминированности. Клетки-предшественники, подобно ветвям дерева, дают начало окончательно дифференцированным клеткам паренхимы стебля или листьев.*

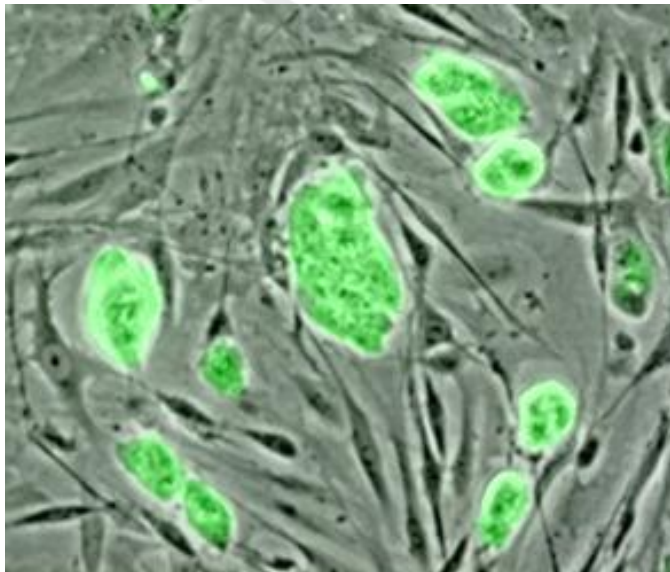


Рис. 1. Стволовые клетки эмбриона мыши с флуоресцентным маркером

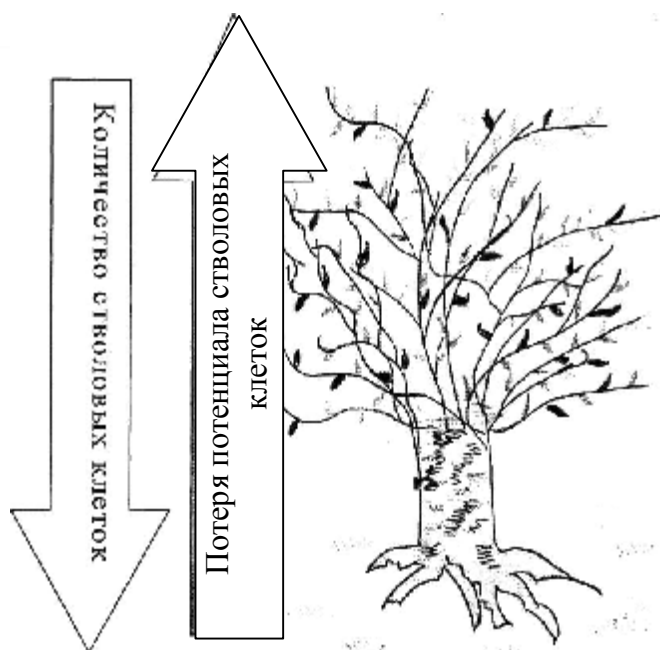


Рис. 2. Стволовые клетки соматических тканей и их роль в нормальном обновлении тканей

В отличие от обычных клеток, выполняющих строго определенные функции в организме, СК обладают возможностью приобретения в ходе развития специализации. Они — универсальный строительный материал, из которого при умелом генетическом манипулировании и соответствующем функциональном и анатомическом окружении «произрастет все, что угодно (нужное организму)», от нейронов мозга, до клеток тканей, выстилающих кишечник [54, 55].

Необратимое преобразование изначально однородных эмбриональных клеток в специализированные, образующие ткани и органы, называется *дифференцировкой*.

Таким образом, СК — это клетки, способные к широкой специализации и сохраняющие эту способность (специализироваться) в течение длительного времени (в течение жизни).

В связи с этим используются также термины: способность к *самовоспроизводству*, т. е. делению, в результате которого образуются опять СК, а также к *самообновлению*, т. е. сохранению жизнеспособности в результате внутриклеточной регенерации СК [42, 54, 57, 62].

За длительную способность к самовоспроизводству эмбриональные СК часто называют «*бессмертными*», т. е. способными длительное время воспроизводить себе подобных. Это свойство СК сейчас широко используется при размножении их в питательной среде.

## ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ, ИЗУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Честь открытия СК принадлежит русскому ученому-гистологу Александру Александровичу Максимову (1874–1928 гг.; член-корреспондент Российской Академии наук, профессор, начальник кафедры гистологии и эмбриологии Военно-медицинской академии, основоположник унитарной теории кроветворения). В 1908 г. он сделал доклад на съезде Немецкого гематологического общества в Берлине о том, что в нашем организме пожизненно сохраняются недифференцированные клетки, которые могут превращаться в специализированные клетки крови и соединительной ткани. Позднее, А.А. Максимов назвал эти клетки «стволовыми», имея в виду, что они находятся в «стволе» — основе кроветворного древа.

Первая попытка медицинского применения СК костного мозга была сделана в 1891 г. двумя известными французскими учеными: Шарлем Броун-Секаром (1817–1894 гг.; физиолог и невропатолог, член-корреспондент Французской академик наук) и Жаком д'Арсонвалем (1851–1940 гг.; физиолог и физик основоположник биофизики, член Французской Академии), которые попытались излечить больного лейкемией путем приема вытяжки костного мозга внутрь («per os»). Естественно, попытка успеха не имела. При этом ученые, конечно, не пытались использовать стволовые клетки костного мозга, о которых они еще ничего не знали, но рассчитывали на лечебный кроветворный эффект самого костного мозга.

Первая успешная пересадка костного мозга была сделана в 1940 г. Моррисом и Самваком (Morrison, Samwach), которые произвели трансплантацию 13 мл костного мозга больному апластической анемией. Можно предположить, что успешность операции объяснялась тем обстоятельством, что донором был монозиготный близнец.

Значительный вклад в изучение СК был внесен российскими учеными Александром Яковлевичем Фриденштейном (1924–1998) и Иосифом Львовичем Чертковым.

Ученые открыли, что в костном мозге существуют два вида мультипотентных стволовых клеток: гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) — предшественники всех типов клеток крови, и стромальные (мезенхимальные) стволовые клетки (ССК) — долгоживущие и редко делящиеся стволовые клетки. Оба типа стволовых клеток постоянно циркулируют в кровотоке.

Свои исследования А. Я. Фриденштейн и И. Л. Чертков обобщили в монографии «Клеточные основы кроветворения (кроветворные клетки предшественники» (М.: Медицина, 1977) [42, 55].

В 1998 г. Джеймс Томсон (Висконсинский университет, США) опубликовал в журнале Science статью о выделении эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) из бластоцист человека. Одновременно с ним Джон Герхарт (Университет Джона Гопкинса, США) опубликовал в *Анналах национальной академии США* статью на эту же тему.

По утверждению журнала Science, выделение и культивирование вне организма (размножение в питательной среде в специальных пластиковых флаконах) ЭСК является третьим по значимости открытием в биологии (после расшифровки двойной спирали ДНК и завершения расшифровки «Генома человека»).

## ХАРАКТЕРИСТИКА ТИПОВ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

В литературе чаще всего используют 2 классификации стволовых клеток:

- 1) способности к дифференцировке (рис. 3);
- 2) источнику их происхождения или выделения (рис. 5).

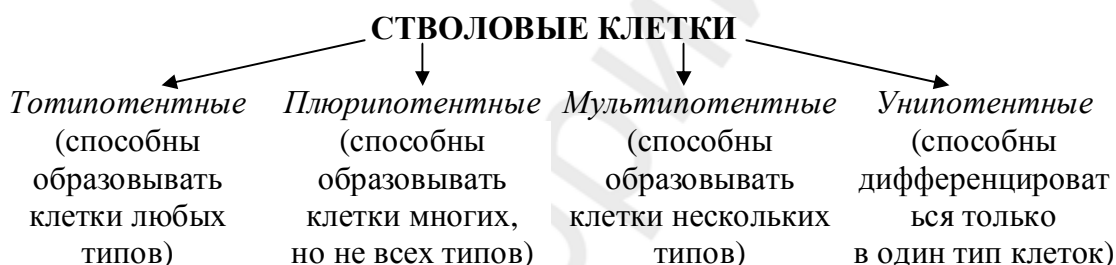


Рис. 3. Классификация СК по способности дифференцироваться

*Тотипотентные* СК (от лат. totus — полный, единый). Эта единственная клетка воспроизводит все органы эмбриона и необходимые для его развития структуры — плаценту и пуповину. К ним относятся только оплодотворенный ооцит и бластомеры 2–8 клеточной стадии.

Термин «*плюрипотентный*» используют для описания клетки, которая может быть источником клеток, производных любого из 3 зародышевых листков (эктодермы, энтодермы, мезодермы). К ним относятся ЭСК, первичные половые клетки и клетки эмбриональных карцином.

*Мультипотентные* СК способны образовывать специализированные клетки нескольких типов (например, клетки крови, клетки печени, головного мозга).

*Унипотентные* СК — это клетки, дифференцирующиеся в обычных условиях только в специализированные клетки определенного типа.



Гистогенетические процессы начинаются в эмбриональном периоде и заканчиваются после рождения. Основой дифференцировки клеток организма являются стволовые клетки. Способность стволовых клеток к большей или меньшей (по «широте») дифференцировке меняется по мере роста и развития эмбриона (рис. 4).

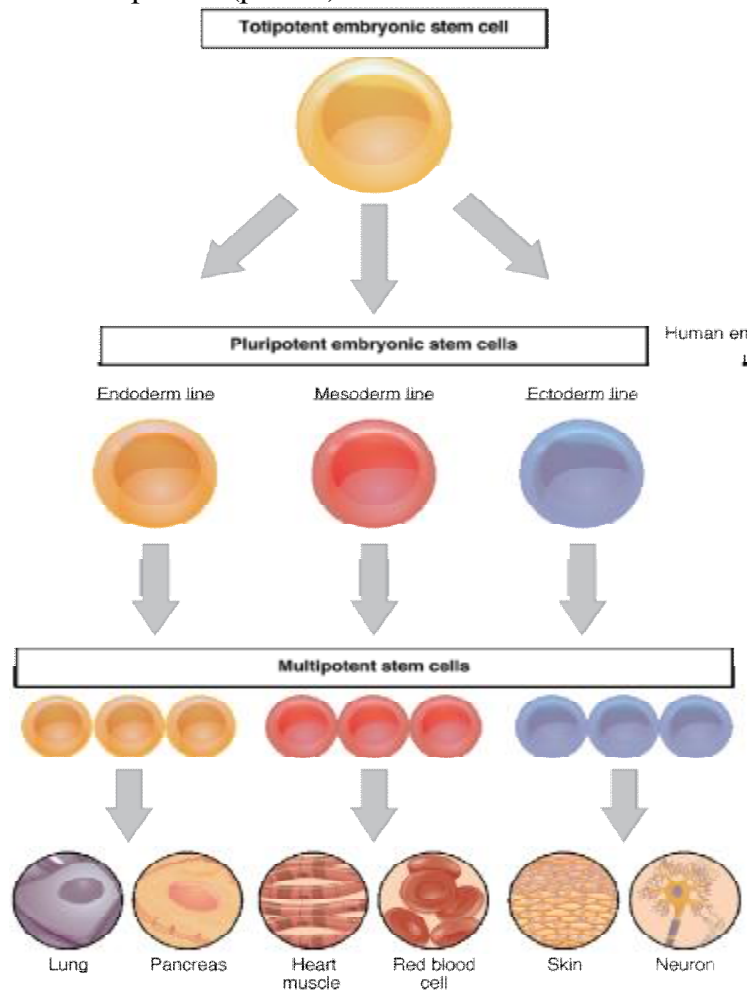


Рис. 4. Классификация стволовых клеток по способности дифференцироваться

Стволовые клетки взрослого организма унипотентны, то есть, способны образовывать клетки только определенных тканей (крови, нервной системы и т. п.). Однако в последнее время в научной печати стали появляться сообщения о так называемой «направленной дифференцировке» (трансдифференцировке) стволовых клеток взрослого организма. Из стволовых клеток костного мозга взрослого организма удалось в результате генетического перепрограммирования получать нервные, мышечные и другие клетки [43, 44, 50, 59, 67, 78].

По происхождению и источнику выделения СК можно разделить на следующие группы (рис. 5):

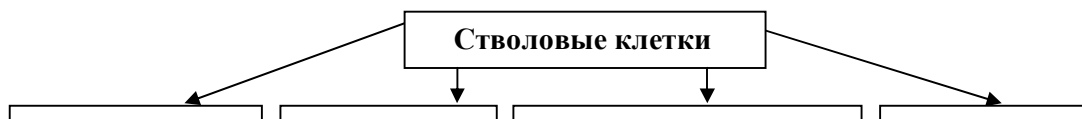


Рис. 5. Классификация СК по источнику происхождения или выделения

**Эмбриональные стволовые клетки** получают из внутренней клеточной массы бластоциста, которые формируются к 4–7-му дню развития после оплодотворения. Эти СК способны дифференцироваться во все типы клеток взрослого организма. Основным источником ЭСК является абортный материал или материал, оставшийся после искусственного оплодотворения.

Обнаружение и выделение СК происходит с помощью *маркеров* (наличие на поверхности этих клеток специфических белков). Существует серия поверхностных маркеров, характеризующих плюрипотентные ЭСК человека. К ним относятся ранние эмбриональные антигены SSEA-3 и SSEA-4 [41, 55].

*Характеристики ЭСК:*

- повышенная активность теломеразы;
- нормальный кариотип;
- способность к интенсивной пролиферации;
- минимальное количество рецепторов;
- тотипатентность с возможностью дифференцировки в любую клеточную линию;
- рост клонами.

Однако экспериментальные работы с человеческим эмбрионом сопряжены со значительными морально-этическими и религиозными проблемами.

**Фетальные СК** получают из абортного материала на 9–12 неделе беременности. Фетальные стволовые клетки — это смесь мультипотентных и унипотентных стволовых клеток [41, 42].

**СК пуповинной и плацентарной крови (СКП).** Источником стволовых клеток с огромным потенциалом является плацентарно-пуповинная кровь. Шанс сохранить СК новорожденного ребенка дается только один раз в жизни — во время родов. В противном случае и пуповина, и плацента подвергнутся «утилизации», то есть будут уничтожены. Эта же участь постигает и уникальную пуповинную кровь.

Сохранение СК можно рассматривать, как одну из форм «биологического» медицинского страхования — однажды полученные СК могут храниться десятилетиями. В случае необходимости, их останется только извлечь из криогенного хранилища и разморозить, не тратя время и средства на поиск и приобретение донорских клеток. Эти СК можно использовать для восстановления любых тканей и органов и лечения разных заболеваний.

СК, выделенные из пуповинной крови, не экспрессируют HLA-DR-антигены. В пуповинной крови есть небольшая популяция CD34+ клеток (около 1 %), не несущих линейных антигенов (CD34+/Lin-). СК

пуповинной крови являются плюрипотентными и имеют целый ряд преимуществ перед клетками из костного мозга и периферической крови. Они менее зрелые, обладают наибольшим потенциалом к делению и дифференцировке. Вероятность инфицирования пуповинной крови минимальная. СК пуповинной крови характеризуются меньшей иммуногенностью при аллогенных трансплантациях, поэтому могут быть использованы при неполной совместимости по HLA-антигенам.

Вопрос об оптимальном количестве трансплантируемых клеток пуповинной крови, необходимом для приживания в организме реципиента, до сих пор не решен [41, 46, 72]. Существенный недостаток трансплантации пуповинной крови — малое количество СК, содержащееся в образцах. Лишь в каждом четвертом образце пуповинной крови стволовые клетки находятся в количестве, достаточном для трансплантации взрослому пациенту. Один из вариантов выхода из этого положения — размножение стволовых клеток в условиях культуры, что таким образом и увеличивает массу трансплантата *in vitro*. Исследования, проведенные в области гемопоэтической дифференцировки СК пуповинной крови, позволили получить различные типы клеток крови. Однако до конкретного использования эритропоидных клеток, дифференцированных из СКП, в клинической практике предстоит решить ряд вопросов [80].

## **СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ВЗРОСЛОГО ОРГАНИЗМА**

У взрослого человека в тех органах и тканях, которые нуждаются в частом обновлении, имеются собственные унипотентные СК — *региональные стволовые клетки* (РСК). Эти клетки узко специализированные, т. е. из них образуются только определенные типы клеток. К ним относятся все СК костного мозга и тканеспецифичные стволовые клетки. Тканеспецифичные стволовые клетки располагаются в различных видах тканей и в первую очередь, отвечают за обновление их клеточной популяции, первыми активируются при повреждении. СК содержатся если не во всех, то в большинстве органов и тканей взрослого организма: в костном, головном и спинном мозге, крови, эпителии кожи и пищеварительного тракта, пульпе зубов, роговице и сетчатке глаза, эндотелии сосудов, скелетных мышцах, поджелудочной железе, печени и др.

СК взрослых обладают двумя качественными особенностями. Во-первых, они на протяжении всей жизни постоянно производят подобные себе клетки. Эта их способность к пролиферации обеспечивает их постоянное самообновление и самоподдержание. Во-вторых, они генерируют зрелые клетки с характерными морфологическими и функциональными

свойствами. Основная роль СК взрослых в живом организме заключается в поддержании и восстановлении тех тканей, в которых они находятся.

Доля стволовых клеток в тканях взрослого организма, как правило, очень мала. Например, кроветворные стволовые клетки (КСК) встречаются с частотой 1 : 10–15 тыс. клеток костного мозга или 1 : 100 тыс. клеток периферической крови. В процессе взросления человека наблюдается значительное снижение количества СК. Для сравнения укажем, что при рождении у ребенка одна стволовая клетка приходится на 10 тыс. обычных клеток, т. е. в организме ребенка присутствует 50 млрд стволовых клеток. У людей в возрасте 60 лет и старше одна стволовая клетка приходится на один миллион обычных клеток [28, 51].

Рассмотрим более подробно виды региональных СК взрослого организма:

- СК кожи;
- СК жировой ткани;
- СК нервной ткани;
- СК мышечной ткани;
- СК костного мозга;
- резидентные СК сердца.

**Популяция стволовых клеток кожи.** Эпидермис представляет собой сложно организованную быстро обновляющуюся клеточную систему. Основным клеточным компонентом являются кератиноциты, однако в эпидермисе представлены и другие клетки, которые также выполняют свои функции (меланоциты, клетки Лангерганса, фибробласты). Базальный слой эпидермиса включает стволовые и транзиторные клетки, которые начинают интенсивно дифференцироваться после перехода в шиповатый слой. Однако в базальном слое встречаются клетки и с маркерами терминально дифференцированных кератиноцитов, что указывает на сложность структурной и функциональной организации эпидермиса [22, 24]. Координированное взаимодействие между различными клетками кожи, как и других тканей и органов осуществляется с помощью межклеточных взаимодействий. С их помощью происходит согласованная регуляция метаболизма, дифференциации, пролиферации и проявления физиологических функций специализированных клеток. Важная роль в регуляции межклеточного взаимодействия принадлежит цитокинам и ростовым факторам, которые, взаимодействуя со специфическими рецепторами, обеспечивают процессы пролиферации клеток, их миграции, дифференцировки и т. д. [57].

**СК жировой ткани.** В течение последних лет жировая ткань рассматривается как альтернативный костному мозгу источник получения мезенхимальных стволовых клеток. Это связано с рядом преимуществ,

которыми обладает жировая ткань: ее технически проще получить, а содержание в жире СК превосходит таковое в костном мозге. По данным литературы, из 1 мл жира сразу после его забора можно выделить около 1 млн СК, через 2 часа — 500 тыс., а через 18 часов хранения жира при 4 °С количество уменьшится еще на 50 %. Однако, несмотря на разные сроки выделения клеток, их жизнеспособность будет составлять 90–98 %. При этом совершенно не важно, из какого участка забирали жировую ткань — количество, жизнеспособность и функциональная активность клеток будет одинаковой. А если учесть, что в норме жировая ткань составляет 15–20 % массы тела у мужчин и 20–25 % — у женщин, то человек имеет довольно значительный резерв для лечения и омоложения. СК жировой ткани по рекомендации «Международного общества по применению технологий пересадки мезенхимальных стволовых клеток, полученных из жировой ткани» принято называть ADSCs (Adipose-Derived Stem Cells) или стромально-васкулярной фракцией, которая включает в себя:

1. Васкулярные (сосудистые) клетки: эндотелиальные, перициты, гладкомышечные, циркулирующие клетки крови — эритроциты, моноциты, макрофаги, Т-лимфоциты, преадипоциты.

2. Фибробластоподобные клетки, которые располагаются вдоль капилляров. Их называют мультипотентными мезенхимальными или стромальными СК. Мезенхимальные клетки жировой ткани обладают высокой пластичностью и способны превращаться не только в хондробласты — в хрящевую ткань, в остеобласты — костную ткань, но и фибробласты — рыхлую соединительную ткань, строму, адипоциты — жировую ткань, в миоциты — мышечную ткань, кардиомиоциты — сердечную мышечную ткань, нейроны — нервную ткань, гепатоциты — ткань печени, эндотелиальные клетки — обеспечивают рост артериальных, венозных и лимфатических сосудов и т. д. (рис. 6) [60].

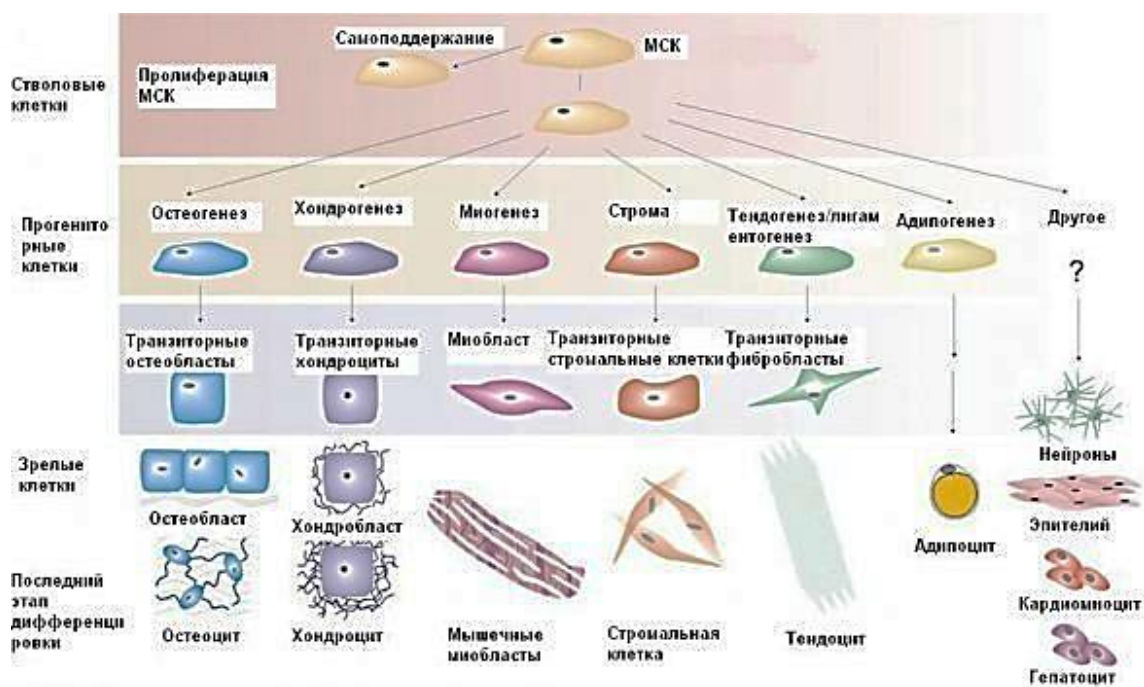


Рис. 6. Пластичность МСК жировой ткани

**Популяция нейральных стволовых клеток.** Исторически считалось, что ЦНС млекопитающих относится к типу тканей, в которой не происходит физиологической репарации, но данные последних лет свидетельствуют в пользу существования в ЦНС нейральных прогениторных клеток (СПК). Нейрогенез и самообновление нейральных стволовых клеток в ЦНС обнаружено в строго локализованных областях мозга:

- субэпендимальный слой спинного мозга;
- субвентрикулярная зона боковых желудочков;
- зубчатая извилина гиппокампа;
- обонятельная луковица;
- обонятельный эпителий.

Нейральные СПК — это мультипотентные клетки, имеющие способность дифференцироваться в любую зрелую клетку нервной системы (астроциты, олигодендроциты, нейроны) (рис. 7). Маркером для нейральных СПК является белок промежуточных филаментов — нестин [47, 65].

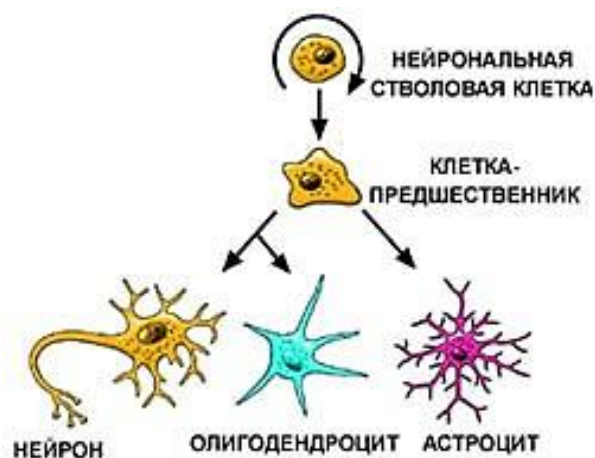


Рис. 7. Схема дифференцировки нейральных СПК

Все возрастающий в последние годы интерес к выделению и культивированию нейральных стволовых и прогениторных клеток обусловлен в первую очередь перспективами их терапевтического использования при травматических повреждениях спинного мозга и дегенеративных заболеваниях ЦНС человека [11, 28, 32, 35, 37, 51, 65]. Для клеточной терапии данных заболеваний в последние десятилетия был использован широкий спектр фетальных, эмбриональных стволовых и прогениторных клеток, однако, определенные преимущества были выявлены у глиальных обкладочных клеток обонятельной выстилки. Они обладают свойствами стимулировать рост аксонов обонятельных нейронов, выделяя ряд белковых факторов роста и создавая благоприятное окружение для регенерации нервных отростков. В медицинской практике с целью лечения повреждений центральной нервной системы использовали как чистую культуру обкладочных глиальных клеток, так и гетерогенную культуру, включающую помимо обкладочных клеток, фибробласты, шванновские клетки, стволовые и прогениторные клетки обонятельной выстилки. В последнем случае наблюдали лучший терапевтический эффект. Результаты можно объяснить комплексным влиянием всех типов клеток на создание микроокружения для регенерирующих структур, механизмы данного процесса не до конца понятны и требует дальнейшего изучения. Минимальные инвазивные методы забора ткани обонятельной выстилки позволяют получать материал для аутологичной трансплантации, что снижает вероятность риска, сопутствующего аллотрансплантации: иммунную реакцию отторжения трансплантата, опасность переноса генетических и вирусных заболеваний.

**Популяция СК мышечной ткани.** В настоящее время идентифицировано 3 популяции СК скелетных мышц:

- клетки-сателлиты;

- клетки в дорсальном участке аорты;
- клетки побочной популяции («side population» cells) или SP-клетки.

Клетки-сателлиты являются предшественниками миоцитов поперечно-полосатой мускулатуры и располагаются под базальной мембраной мышечного волокна. В норме эти клетки находятся в состоянии покоя, но в период постнатального роста или при необходимости регенерации мышечного волокна они способны к пролиферации. У взрослых млекопитающих клетки-сателлиты являются медиаторами мышечного роста, а при повреждениях могут трансформироваться в миогенные клетки-предшественники, которые затем дифференцируются в миофибриллы скелетных мышц.

В поперечно-полосатых мышцах человека присутствуют небольшая популяция стволовых клеток (SP-клетки). Стволовые SP-клетки присутствуют в мышцах, костном мозге и принимают участие в регенерации мышц. Клетки SP-популяции экспрессируют маркеры CD45 и stem cell antigen (Sca-1), характерные для гемопоэтических клеток. Располагаются клетки SP-популяции между мышечными волокнами и тесно связаны с кровеносными сосудами. Клетки SP-популяции обладают как миогенным, так гемопоэтическим потенциалом.

В отличие от других взрослых СК мышечные СК при введении реципиентам не отторгаются их иммунной системой, так как на поверхности этих СК отсутствуют белковые маркеры [42, 51, 71].

**Стволовые клетки сердца.** Длительное время считалось, что клеточная регенерация миокарда не происходит, именно поэтому сердце не восстанавливает нормальную функцию после ишемического повреждения. Ранее исключалось присутствие в нем СК. В настоящее время установлено, что сердце содержит пул незрелых кардиомиоцитов и обладает определенным регенеративным потенциалом [62,71, 83]. Существует две гипотезы, объясняющие появление делящихся кардиомиоцитов в сердце после инфаркта. Согласно первой гипотезе, в сердце существует популяция резидентных стволовых клеток, которые могут участвовать в регенерации миокарда при его повреждении. Источником СК сердца являются клетки из кардиогенных пластин в эмбриогенезе, экспрессирующие транскрипционный фактор *islet-1*, которые остаются в сердце после рождения и могут вступать в клеточный цикл во взрослом организме. Согласно второй гипотезе, в крови циркулируют прогениторные клетки, которые выходят из костного мозга в ответ на повреждение миокарда и мигрируют в зону ишемии [62, 70, 82, 83].

Резидентные СК сердца представляют собой популяцию клеток взрослого сердца, для которых характерна способность к самообновлению, пролиферации и мультипотентность. У разных видов



животных и человека, в зависимости от способа выделения, культивирования и экспрессии маркеров, описывают три популяции резидентных СК сердца. Различают: SP-клеточную популяцию, c-kit позитивные клетки (c-kit является рецептором фактора стволовых клеток — SCF) и кардиобласты, экспрессирующие islet-1 [45, 83, 84].

Стволовые клетки сердца находятся в нишах — анатомически хорошо защищенных зонах миокарда, в наименьшей степени подверженных гемодинамическим нагрузкам — верхушка желудочка и предсердия. В нишах СК сердца они имеют тесную связь с коммитированными клетками-предшественниками, а также со стромальными клетками ниши, которые регулируют процессы дифференцировки и поддержания СК сердца. Пролиферация СК сердца в нише находится под контролем факторов роста и цитокинов. При стимуляции пролиферации СК (например, при инфаркте миокарда или аортальном стенозе), в результате ассиметричного деления образуется две клетки. Одна — собственно de novo стволовая клетка, остается связанной со своим микроокружением в нише, другая становится сначала прогениторной клеткой, а затем коммитированным предшественником, экспрессирующим транскрипционные факторы, а затем структурные белки, покидает нишу и участвует в регенерации поврежденного миокарда, формируя новые сосуды и кардиомиоциты. В одной и той же «нише» могут локализоваться клетки, дифференцирующиеся в разных направлениях: эндотелиальном, гладкомышечном, кардиомиоцитарном или в фибробласты.

Возможность выделения и экспансии стволовых клеток сердца в условиях *in vitro* с целью изучения их свойств и использования для клеточной терапии представляется перспективным направлением в науке и медицине и открывает новые возможности в лечении больных с тяжелой сердечной недостаточностью.

### **ПОПУЛЯЦИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА**

Количество СК в костном мозге максимально и представлено следующими видами клеток.

**Гемопозитические стволовые клетки.** ГСК обеспечивают регенерацию клеточных компонентов крови и иммунной системы (эритроцитов, тромбоцитов, лимфоцитов, моноцитов и др.). Постоянный пул этих клеток сохраняется на протяжении всей жизни человека благодаря их высокому пролиферативному потенциалу. Источники ГСК — костный мозг, периферическая кровь.

В настоящее время появился более совершенный способ получения стволовых клеток у донора — из периферической крови.

Основные принципы выполнения процедуры мобилизации и забора стволовых клеток из периферической крови [20, 24]:

1. В крови здорового человека количество циркулирующих предшественников гемопоэза не велико, поэтому требуется проводить мобилизацию периферических стволовых клеток доноров с помощью определенных препаратов (например, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора) в течение 5 дней.

2. Забор периферических стволовых клеток крови осуществляется методом лейкоцитозера. Во время этой процедуры кровь откачивается специальным насосом из локтевой вены, проходит через специальный аппарат — клеточный сепаратор — и возвращается донору. Во время каждого прохождения через аппарат отбирается только небольшое количество стволовых клеток, поэтому таких циклов совершается много. Всего за процедуру через сепаратор проходит 10–15 литров крови, из которых в аппарате остается всего 50–200 мл. Остальные компоненты крови возвращаются донору.

3. Стволовые кроветворные клетки определяют методом проточной цитофлюориметрии.

4. Накапливается определенное количество СК, а затем вводится больному.

Сама трансплантация ГСК по процедуре напоминает обычное переливание крови, за которым следует период ожидания приживления пересаженных стволовых гемопоэтических клеток. Происходит миграция клеток-предшественников гемопоэза в костномозговое пространство и установление связей со стромальным компонентом.

К настоящему времени достигнуты определенные успехи наращивания биомассы ГСК в условиях культуры. Для изучения условий культивирования стволовых клеток из различных источников (костный мозг, мобилизованная периферическая кровь) используются различные цитокины (факторы роста и ингибиторы дифференцировки клеток) и их комбинации. Идентификация ГСК осуществляется по их маркерам CD14, CD34, CD45 и CD68 [57, 82, 85].

ГСК костного мозга здоровых людей применяются с 1970-х г. для восстановления кроветворения у облученных людей и больных лейкозами. Аллогенная трансплантация ГСК костного мозга и периферической крови (в результате мобилизации ГСК из костного мозга) с 1990-х г. используется в специализированных центрах Республики Беларусь. В настоящее время накоплен большой опыт лечения различных форм лейкозов, апластических анемий и ряда других тяжелых заболеваний крови с помощью трансплантации костного мозга. Она позволяет во многих случаях добиться радикального излечения больных. Начиная с 1990-х г. ГСК человека применяются также для устойчивого переноса генов, дефектных у реципиента костного мозга, например имеющих врожденный иммунодефицит. Однако осуществление

трансплантации костного мозга связано со значительными трудностями в подборе подходящего донора из международных регистров.

Спектр возможного применения ГСК неуклонно расширяется. В последние несколько лет ГСК стали использовать и для лечения негематологических болезней. Это заболевания, связанные, как правило, с нарушением функционирования иммунной системы — ревматоидный артрит, системная красная волчанка, болезнь Крона, рассеянный склероз, устойчивые к лечению артриты (рис. 8). Другая область применения ГСК — онкология. Появились данные о возможности лечения рака груди и почки. Разрабатываются протоколы применения ГСК для лечения болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, сахарного диабета первого типа, инфаркта миокарда, апластической анемии [11, 46, 72, 77, 82].

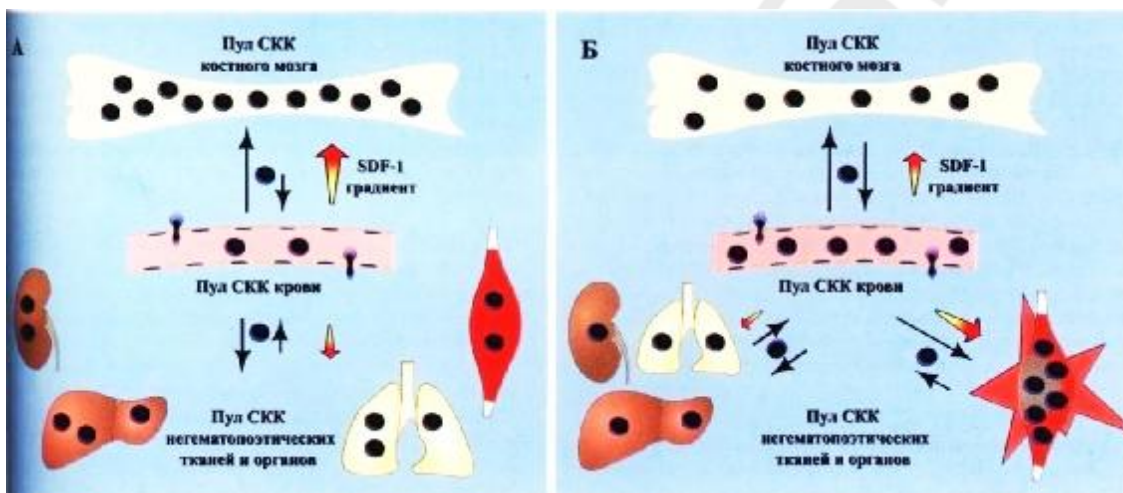


Рис. 8. Динамика равновесия между СК костного мозга, крови и негематопозитических тканей и органов в норме и патологии

**Мезенхимальные (стромальные) стволовые клетки.** МСК костного мозга представляют собой популяцию плюрипотентных клеток, способных дифференцироваться в направлении хондроцитов, остеобластов, адипоцитов, гепатоцитов, альвеолярных и ряда других стромальных клеток. Эти СК получают из костного мозга, который содержится в плоских костях. МСК в костном мозге присутствуют в количестве 0,001–0,01 %.

Одним из свойств МСК является высокая адгезивная способность, на которой основан способ их выделения [73]. МСК, выделенные из костного мозга молодых доноров, обладают большим пролиферативным потенциалом. С возрастом количество МСК и их пролиферативный потенциал снижаются. МСК интенсивно размножаются *in vitro*. Несмотря на то, что МСК человека можно сравнительно легко получить и культивировать в стандартных условиях, после длительного культивирования *in vitro* МСК теряют потенциал пластичности [16, 23].

Очевидно, что при выращивании МСК *in vitro* в терапевтических и экспериментальных целях необходимо учитывать ряд различных параметров. Количество и функциональные свойства МСК, полученные из аспиратов костного мозга, варьируют у различных доноров [2, 3, 73, 82].

МСК имеют морфологию фибробластов, в культуре образуют монослой. Свежевыделенные МСК несут на своей поверхности антигенные детерминанты SH2, SH3, CD29, CD44, CD73, CD90, CD106, CD120a, CD124.

*Главными функциями МСК костного мозга* в организме являются:

1. Формирование гемопозиндуцирующего микроокружения.
2. Формирование стромального микроокружения.
3. Участие в морфогенезе.
4. Самоподдержание и восстановление пула МСК.

5. Участие в гомеостатических реакциях организма и в процессах регенерации, репарации и адаптации системы мезенхимальных клеток в норме и патологии.

6. Способность (прямо и опосредованно) взаимодействовать с клетками иммунной системы посредством растворимых факторов и клеточно-контактным взаимодействием, и в значительной степени модулировать иммунный ответ организма.

Плюрипотентность, специфическая миграция в область повреждения и адгезионные свойства — все это обуславливает восстановительную функцию МСК. МСК способны мигрировать к месту повреждения, закрепляться, дифференцироваться и осуществлять функцию замещенных клеток. Именно эти свойства МСК позволяют использовать их для репарации и регенерации тканей, например миокарда, нервной ткани, костей, сухожилий, хрящей. Однако все большее количество исследователей считают, что терапевтический эффект трансплантации МСК, доказанный во многих доклинических и клинических испытаниях, определяется не только дифференцировкой, но и регуляторной функцией этих клеток. МСК не вызывают развитие иммунного ответа, но способны подавлять иммунные реакции [7, 13, 14, 73].

***Мультипотентные взрослые прогениторные клетки.*** Совместно с МСК выделяется очень малочисленная популяция адгезивных клеток, получивших название мультипотентных взрослых прогениторных клеток (multipotent adult progenitor cells, MAPCs). Эти клетки обладают широким диапазоном пластичности и участвуют в формировании практически всех типов соматических клеток. MAPCs экспрессируют некоторые маркеры эмбриональных стволовых клеток (Oct-4, Rex-1, SSEA-1). Неизвестно, являются ли эти клетки плюрипотентными эмбриональными, которые сохранились на протяжении всей жизни взрослого организма, редкой

субпопуляцией МСК или это результат длительного культивирования МСК in vitro [77, 82].

## ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

**Способность к самообновлению и пролиферации**, т. е. к длительному (возможно, больше продолжительности жизни человека) размножению и продукции большого количества себе подобных клеток.

С этой точки зрения стволовые клетки, хранящиеся и размножающиеся в культуре ткани можно условно называть «бессмертными». СК способны к так называемому «асимметричному делению» (рис. 9).



Рис. 9. Симметричное и асимметричное деление СК

При симметричном делении происходит логарифмическое нарастание количества дочерних клеток, идентичных друг другу и сохраняющих все характеристики родительской клетки.

При асимметричном делении одна клетка остается стволовой, а другая становится более или менее детерминированной. Происходит линейное накопление количества клеток.

В тканях взрослого организма потомство стволовой тканевой клетки становится все более дифференцированным (подвергается дифференцировке), частично сохраняя способность к пролиферации, и является основным источником восстановления тканей (рис. 10).

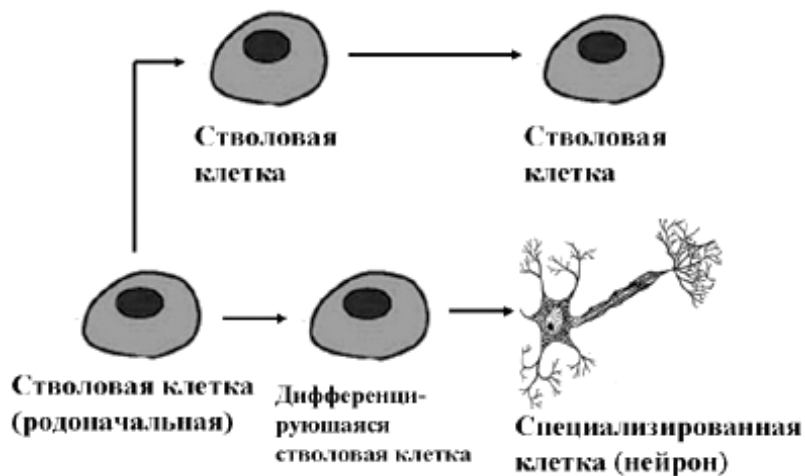


Рис. 10. Асимметричное деление стволовых клеток

В случае такого типа клеточного деления одна стволовая клетка, делясь, превращается в две, а из них одна продолжает делиться и производить аналогичные стволовые клетки, другая вступает на путь дифференцировки. Если бы дело обстояло иначе, организм достаточно быстро израсходовал бы весь запас стволовых клеток, и обновление тканей стало бы невозможным (в данном случае речь идет о стволовых клетках взрослого организма) [55].

**Способность СК к дифференцировке и трансдифференцировке.** Процесс дифференцировки запускается с прикрепления стволовых клеток друг к другу или к подложке (если речь идет о выращивании стволовых клеток в культуре ткани), так как рецепторы адгезии и цитоскелет клеток играет большую роль в передаче сигнала к началу дифференцировки из внеклеточной среды в клеточное ядро.

В настоящее время изучено ограниченное число факторов, обеспечивающих направленную селективную дифференцировку эмбриональных стволовых клеток. Так, например, ретиноевая кислота индуцирует нейрогенез, Р-TGF (трансформирующий фактор роста) стимулирует образование мышечных клеток, ИЛ-6 (интерлейкин-6) и ИЛ-3 (интерлейкин-3) — образование элементов крови, BMP-2 (морфогенетический протеин кости — Bone Morphogenetic Protein) — образование эпителиальных клеток.

Ведутся эксперименты по применению комбинаций ростовых факторов для направленной селективной дифференцировки стволовых клеток. Для образования дифференцированных клеток специфических типов — миокарда, крови, нервных и других — изучается возможность контроля за дифференцировкой ЭСК.

Дифференцировка ЭСК начинается при смене среды, добавлении сыворотки и элиминации LIF (лейкемического ингибирующего фактора) из среды.

В качестве химических сигналов, позволяющих осуществлять целенаправленную дифференцировку ЭСК, применяют разнообразные факторы роста — преимущественно белки, участвующие на ранних стадиях в формировании разных клеточных типов. Например, активин А индуцирует преимущественно мезодерму и главным образом мышечные клетки (скелетные и сердца).

Эпидермальный фактор роста индуцирует мезодерму и эктодерму (специфичен для клеток кожи), а фактор роста нервов воздействует на мезодерму, эктодерму и энтодерму (специфичен для клеток печени и поджелудочной железы) [9, 10, 13, 15, 16, 19, 25, 28, 74].

С точки зрения классической эмбриологии детерминация рассматривается как однонаправленный процесс. Термин «трансдифференцировка» описывает репрограммирование клетки, которая уже вступила на путь дифференцировки.

Однако в настоящее время доказано, что достаточно детерминированные тканевые клетки предшественники одной ткани способны дифференцироваться в зрелые, окончательно дифференцированные клетки другой ткани.

Например, костный мозг взрослого человека содержит минимальное количество недифференцированных стволовых клеток, обладающих достаточной пластичностью для того, чтобы давать потомство, способное дифференцироваться в самые разные типы зрелых клеток в зависимости от микроокружения. Это превращение можно рассматривать не как трансдифференцировку, а скорее как пластичность (рис. 11) [34, 55].

Практическим следствием способности СК к делению и дифференцировке является их *пластичность*, т. е. способность продуцировать потомство, которое может приобретать фенотипические черты зрелых клеток различных тканей.

Термин тотипотентность закреплен за клетками, которые могут служить источником как всех тканей организма, так и плаценты [81, 82].

Термины плюрипотентность и мультипотентность с точки зрения диагностики являются синонимами, т. к. относятся к клеткам, способным приводить к появлению клеток, дифференцированных в самых разных направлениях. Они являются предшественниками для СК развивающихся органов.

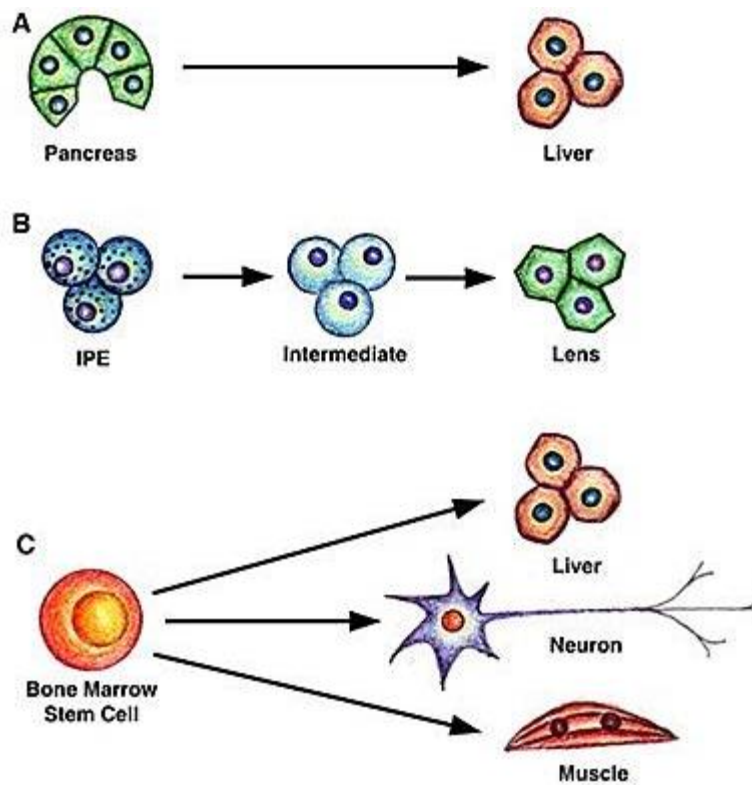


Рис. 11. Трансдифференцировка зрелых клеток

Во взрослом организме клетки, ответственные за обновление тканей, не являются тотипотентными и способны формировать дифференцированные ткани. Так, соматические СК бронхиального эпителия дают потомство клеток, которые могут становиться нейроэндокринными, мукозными или реснитчатыми клетками, а при патологических условиях могут трансдифференцироваться даже в ороговевающий эпителий.

Гемопозитические и/или стромальные СК костного мозга в норме способны давать начало предшественникам самых разных клеток, включая эритроциты, тромбоциты, гранулоциты, моноциты, лимфоциты и даже эндотелиальные клетки.

Интересно, что в костном мозге, коже и других интенсивно пролиферирующих тканях СК обычно не делятся и находятся в состоянии покоя, а обновление этих тканей осуществляется пролиферацией дочерних клеток, продолжающих процесс дифференцировки.

Завершением этого процесса является появление окончательно дифференцированных клеток, таких как гранулоциты крови, ороговевающие эпителиальные клетки кожи. СК обладают способностью при определенных условиях дифференцироваться в ткани эктодермального, мезодермального и энтодермального происхождения.



Основным источником роста, восстановления и регенерации соматических тканей в настоящий момент принято считать костный мозг, клетки которого, как было доказано в экспериментальных исследованиях, могут давать начало всем тканям таких органов, как сердце, легкие, кишечник, печень, кожа, мозг и др. И это является нормальным физиологическим процессом, постоянно протекающим в организме взрослого человека [20, 21, 23, 27, 31, 55, 78].

Таким образом, в течение всей жизни индивидуума в организме сохраняются СК, обладающие мультилинейным потенциалом дифференцировки, а КМ представляет собой резервуар мультиплюрипотентных стволовых клеток, которые могут покидать КМ и попасть в другие ткани (рис. 12).

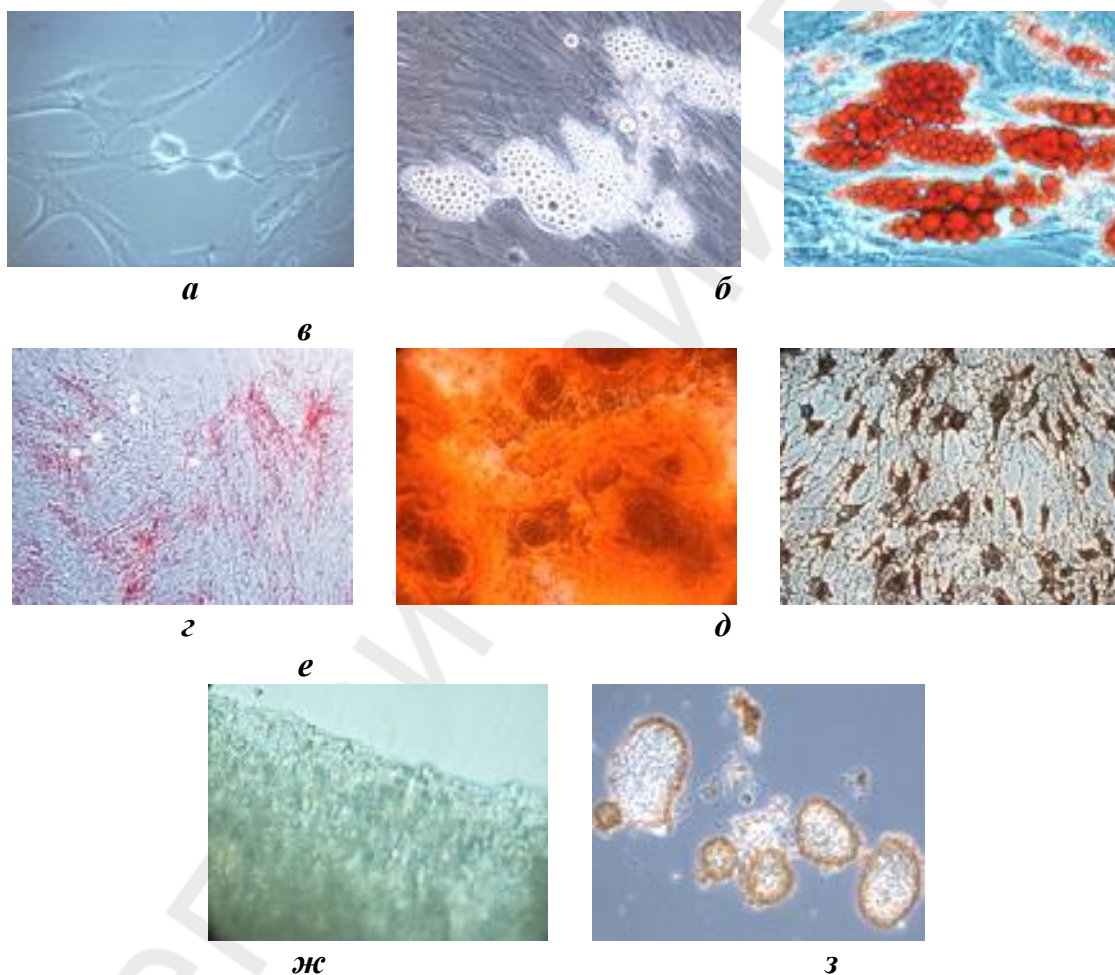


Рис. 12. Дифференцировка и трансдифференцировка ММСК в разные типы клеток: *а* — митотическое деление мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) жировой ткани человека; *б* — дифференцировка ММСК человека в клетки жировой ткани (адипоциты); *в* — дифференцировка ММСК человека в клетки жировой ткани (адипоциты) — специфическая окраска; *г* — ММСК, направленные в остеодифференцировку — специфическая окраска на щелочную фосфатазу; *д* —

специфическая окраска костных пластинок, полученных при направленной дифференцировке МСК; *e* — специфическая окраска остеоцитов, полученных из МСК человека; *ж* — дифференцировка МСК в хондробласты (нативный препарат); *з* — дифференцировка

МСК в хондробласты — иммуногистохимический анализ

Считалось, что тканеспецифичные СК не способны образовывать другие типы клеток в организме. В настоящее время научные данные показывают, что тканеспецифичные СК могут преодолевать присущие им ограничения при действии специфического набора сигналов как *in vitro*, так и *in vivo* (хотя это репрограммирование адекватно не отражает потенциалы, которые в норме осуществляются *in vivo*). Судьба СК контролируется как внутренними регуляторами, так и внеклеточным окружением (ниша). При соответствующих условиях в клеточной культуре, СК могут дифференцироваться спонтанно. Однако спонтанная дифференцировка, как правило, не всегда отвечает поставленным запросам, так как приводит к образованию гетерогенной популяции дифференцированных и недифференцированных клеток, которые не пригодны для клеточной терапии. Развитие СК и дифференцировка *ex vivo* контролируется набором ростовых факторов, сигнальных молекул и генетических манипуляций [6, 46].

У млекопитающих ни транsdифференцировка, ни дедифференцировка не являются естественно протекающими процессами (за исключением определенных болезней). Открытие пластичности СК увеличивает возможность репрограммирования ограниченной судьбы клетки. Используют 3 критерия для определения пластичности СК: дифференцировка одной клетки во многие линии клеток; функциональность дифференцированных клеток *in vitro* и *in vivo*; персистентная приживляемость трансплантированных клеток [9, 11, 14, 17, 19, 31].

Таким образом, тканеспецифичные стволовые клетки способны дифференцироваться в другие типы клеток, но *in vivo* этот процесс малоэффективен. Тем не менее, сейчас разрабатываются подходы, делающие возможным использование этого источника стволовых клеток.

**Индукцированные плюрипотентные СК.** Нобелевская премия в области медицины и физиологии в 2012 г. присуждена специалистам по клеточной биологии — Синье Яманака (Япония) и Джону Гердону (Британия) за работы по стволовым клеткам и клонированию животных. Группа ученых под руководством Яманака разработала метод получения из обычных клеток человека (фибробластов кожи), индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (*induced pluripotent stem cells* — *iPS* — ИПСК). ИПСК получают из соматических клеток, репрограммируя их

до плюрипотентного состояния с помощью набора транскрипционных факторов (рис. 13).

Ученым удалось с помощью генетических манипуляций «перепрограммировать» клетки, которые уже «получили» определенную специализацию в организме. Используя ретровирусную трансфекцию, ученые произвели трансформацию мышинных эмбриональных фибробластов в ИПСК с помощью комбинации факторов Oct-4, Sox2, c-Myc и Klf4. Та же самая комбинация факторов способна индуцировать плюрипотентное состояние и в клетках человека [31]. По мнению многих экспертов, если с помощью метода Яманака удастся создавать неограниченный запас стволовых клеток, то это позволит «выращивать» нужные ткани организма и произведёт революцию в трансплантологии (рис. 14).

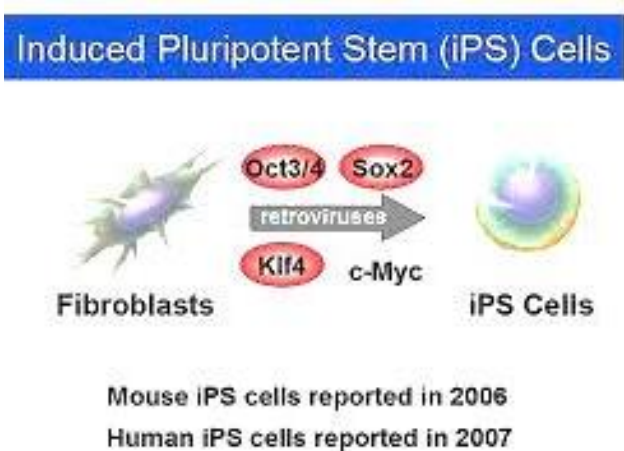


Рис. 13. Схема получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

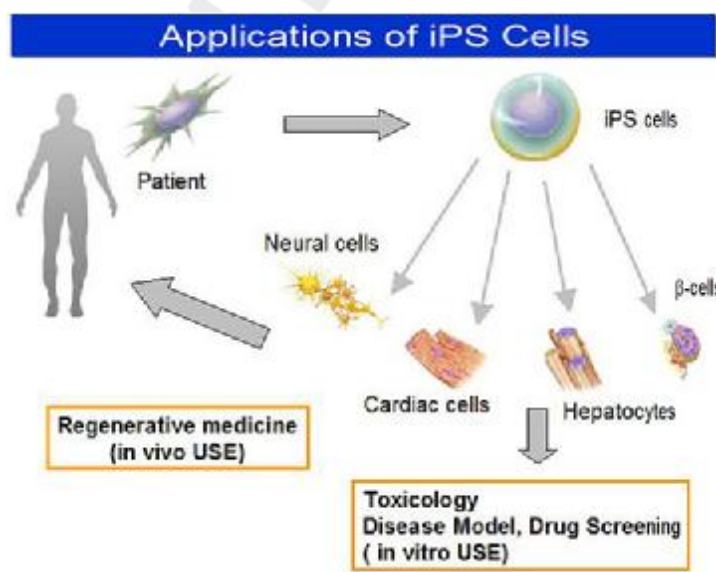


Рис. 14. Возможности использования ИПСК в регенеративной медицине

*Преимущества ИПСК по сравнению с ЭСК:*

– получение не требует использования человеческих бластоцист, которые остаются невостребованными после процедуры ЭКО, что снимает этические проблемы;

– в перспективе могут быть получены рутинными методами из клеток любого пациента, что снимает проблемы иммунологической совместимости.

## **ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ О ЦИТОКИНАХ И РОСТОВЫХ ФАКТОРАХ — РЕГУЛЯТОРАХ МЕЖКЛЕТОЧНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ**

**Цитокины** — эндогенные регуляторные пептиды, продуцируемые практически всеми ядродержащими клетками организма, причем гены некоторых цитокинов экспрессируются во всех без исключения клетках организма. В настоящее время известно более 30 цитокинов.

*Классификация цитокинов:*

– интерлейкины (ИЛ) со сложившимися исторически порядковыми номерами;

– интерферон;

– факторы некроза опухолей (ФНО) — ФНО $\alpha$  и ФНО $\beta$ ;

– колониестимулирующие факторы (КСФ);

– хемокины и некоторые другие.

*Общие закономерности функционирования системы цитокинов:*

1. Синтез большинства цитокинов индуцируется, в покоящейся клетке синтезируются только небольшое количество ИЛ-12 и ИЛ-15.

2. Действие цитокинов локально, цитокины практически не поступают в системный кровоток. Только при интенсивных и длительных воспалительных процессах в крови накапливаются ИЛ-1, ФНО $\alpha$ , ИЛ-6, при миеломе — ИЛ-6, при ряде опухолей — ИЛ-10.

3. Цитокины синтезируются на протяжении небольшого периода времени (от 1–2 суток до 6 суток) и быстро выводятся из организма (от нескольких минут до нескольких часов).

4. Каждый тип клеток иммунной системы способен продуцировать несколько цитокинов, и каждая разновидность может секретироваться разными клетками.

5. Один и тот же цитокин может выполнять несколько функций (плейотропность эффектов), а одна и та же функция (действие) может выполняться разными цитокинами (взаимозаменяемость). Выработка цитокинов со сходным спектром активности осуществляется разными типами клеток.

6. При действии цитокина сигнал внутрь клетки проводится путем взаимодействия со специфическими клеточными рецепторами [79, 85].

*Ростовые факторы* — это группа белковых молекул, влияющих на дифференцировку, пролиферацию клеток.

К ростовым факторам широкого спектра действия относят:

- инсулиноподобные факторы;
- факторы роста фибробластов (FGF);
- эпидермальный фактор роста (EGF);
- тромбоцитарный фактор роста (PDGF) и др.

*Мобилизация и хоуминг* — это свойства, характерные для некоторых СК. *Мобилизация* выражается в способности СК мигрировать к поврежденному органу, *хоуминг* — способности СК возвращаться «домой», т. е. в место изначальной локализации. Для мобилизации стволовых клеток большую роль отводят таким цитокинам, как G-CSF, SCF, IL-3, Flt-3L, TPO. Пусковым механизмом к мобилизации служат молекулярные сигналы из очага повреждения, например, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), решающую роль в синтезе которого играет тканевая гипоксия [73].

Немаловажной для клеточной терапии является высокая миграционная способность СК. Предполагают, что мобилизация и хоуминг представляют собой цепь взаимосвязанных физиологических событий, представляющую интерес с точки зрения возможности целенаправленного воздействия на ее звенья с целью повышения эффективности репаративной клеточной терапии.

## КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

Основные направления, по которым развиваются биомедицинские клеточные технологии:

- технологии культивирования (получения, хранения) СК;
- создание банков (хранение, идентификация, управляемость) СК;
- клеточная трансплантология;
- терапевтическое клонирование;
- тканевая инженерия;
- регенеративная медицина (рис. 15) [41, 42, 52, 57, 58, 82].

## Клеточные технологии → Регенеративная медицина



Рис. 15. Основные направления клеточных технологий

По характеристике трансплантированных СК по отношению к реципиенту (человеку) выделяют 3 группы стволовых клеток:

1. Аллогенные СК (полученные из донорского материала).
2. Аутологичные или собственные СК.
3. Ксеногенные СК (полученные от животных).

## МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

### ВЫДЕЛЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Для накопления необходимой биомассы СК для трансплантации необходимо оптимизация методов их выделения и культивирования *in vitro*. К настоящему времени разработана практически единая технология получения и культивирования только эмбриональных стволовых клеток [15, 41, 66, 81].

Различают 2 типа ЭСК: ES-(embryonic stem cells) и EG-(embryonic germ cells). Эти клетки различаются источниками получения. ES-клетки получают из культивируемых *in vitro* эмбрионов на стадии ранней бластоцисты. EG-клетки изолируют из клеток зародышевого гребня эмбрионов (для человека — 4–5 недель) после вынужденного прерывания беременности. В настоящее время получены ES- и EG-линии клеток человека, мыши, обезьяны, норки и др. животных. ES- и EG-клетки различных видов животных и человека получают и культивируют в

близких условиях. Они обладают сходной морфологией и близкими свойствами.

К основным свойствам культивированных ЭСК относят:

- способность к длительной (практически не ограниченной) пролиферации с сохранением морфологии колоний клеток и индекса их пролиферации при определенных условиях культивирования (среда ДМЕМ

с высоким содержанием глюкозы, сыворотки эмбриона коров — 20 %, LIF — 1000 ед. мл, фидер из обработанных митоцином С эмбриональных фибробластов мыши);

- стабильность диплоидного кариотипа;

- стабильность экспрессировать ранние эмбриональные маркеры: щелочную фосфатазу и SSEAs (stage specific embryonic antigens);

- плюрипотентность или тотипотентность, т. е. способность дифференцироваться во все или почти во все типы клеток тканей эмбриона, что показано как *in vitro*, так *in vivo* [55].

Основным источником выделения ЭСК являются 5-дневные бластоцисты, состоящие из двух индивидуальных клеточных пластов — клеток внутренней клеточной массы (ВКМ) и трофобластической оболочки.

Клетки ВКМ плюрипотентны и представляют собой собственно ЭСК, в то время как трофобластическая оболочка коммитирована исключительно в клетки зародышевых оболочек и плаценты [5, 12, 15, 26, 27, 41, 55].

Нормальный 5-дневный человеческий эмбрион *in vitro* состоит из 200–250 клеток, в большинстве своем составляющих трофобластическую оболочку [27]. Для получения ЭСК трофобластическая оболочка удаляется микрохирургическим или иммунохирургическим способом (при котором антитела к трофобластической оболочке разрушают ее, высвобождая ВКМ). Оставшаяся ВКМ состоит на данной стадии развития из 30–34 клеток [15].

Клетки ВКМ помещают в специальные культуральные флаконы с ростовой средой. В качестве питательных сред используют стандартные синтетические среды на основе фосфатно-солевых буферных растворов: Дульбеко-модифицированная среда Игла (Д-МЕМ), среда Д-МЕМ в модификации Искова (ДИ-МЕМ) с добавлением ростовых факторов — цитокинов (ЛИФ, ИЛ-6, SCF). В качестве субстрата для адгезии и пролиферации клеток используют монослой эмбриональных мышечных фибробластов, предварительно инактивированных  $\gamma$ -излучением [12, 15, 27].

Культивирование проводят в термостатах с подачей 5 %  $\text{CO}_2$  при 37 °С. По прошествии 9–15 дней клетки ВКМ делятся и образуют новые группы клеток (агрегаты), содержащих 8–16 клеток. После чего их собирают, разбивают на отдельные клетки пипетированием и переносят в новые чашки с аналогичным составом среды, культивируют, визуально

выбирают гомогенные колонии и вновь переносят на новые чашки. После нескольких пересевов (пассажей) возможно получение клеточных линий.

После накопления необходимой клеточной биомассы в условиях культуры ЭСК клетки используются как для немедленной трансплантации, так и селективной дифференцировки и последующей их трансплантации.

Для инициации дифференцировки в том или ином направлении из полной среды удаляют ЛИФ и добавляют соответствующий ростовой фактор, биологические добавки и другие факторы для образования той или иной ткани с адекватной для данной ткани питательной средой и условиями культивирования.

При необходимости они хранятся в условиях глубокого замораживания (жидкий азот) для их дальнейшего использования. Имеются данные, что одна из пяти первоначальных линий, полученных таким методом, растет в пассажах *in vitro* в течение двух лет и дает 300-кратное удвоение клеточной массы [15].

### **ВЫДЕЛЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МСК КОСТНОГО МОЗГА**

Костный мозг преимущественно получают путем вымывания его из бедренных костей у мышей и других мелких лабораторных животных или путем аспирации его из подвздошной кости у людей. Для накопления необходимого количества МСК необходимо их предтрансплантационное культивирование [41]. Поскольку в костном мозге присутствует лишь небольшое количество внеклеточного матрикса, строму и гематopoэтические клетки переводят в суспензию механической диссоциацией (как правило, путем ряда пассажей через иглы с уменьшающимися диаметрами). При низкой плотности посева такой клеточной суспензии, стромальные костномозговые стволовые клетки быстро адгезируются, приобретая фибробластоподобную морфологию, хотя возможно и сохранение округлой формы при культивировании, после чего могут быть отделены от неадгезивных гематopoэтических клеток посредством повторных отмываний. В условиях культуры с использованием необходимых питательных сред, сыворотки МСК (стромальные) образуют клеточные колонии, каждая из которых происходит от одной клетки предшественника (рис. 16, 17, 19). Исследование клеточного цикла показало, что только 10 % клеток в мезенхимальных колониях участвуют в процессах пролиферации. Большинство фибробластоподобных элементов находится в состоянии покоя.

В свою очередь, на основании анализа ДНК и РНК, а также характера культивирования было установлено, что покоящиеся МСК представляют собой неоднородную группу. Часть из них, по-видимому, встала на путь коммитирования и дифференцировки в том или ином направлении.



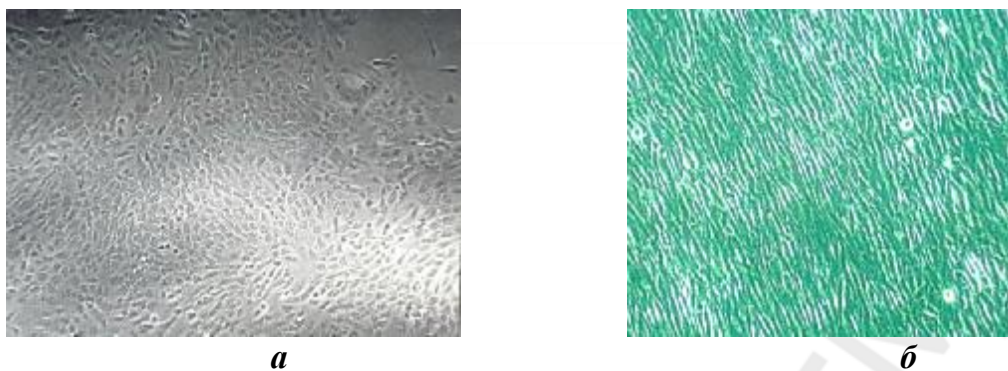


Рис. 16. Морфология культуры клеток костного мозга человека:  
*a* — эпителиоидная колония; *б* — фибробластоподобная (объектив  $\times 20$ )

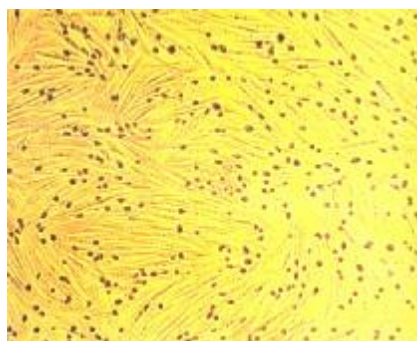


Рис. 17. Культура мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, полученных из костного мозга кролика, 21 сутки роста. Окраска азуром II, увеличение  $\times 20$

Не существует единого протокола культивирования МСК *in vitro*, практически каждая лаборатория предлагает свои вариации состава ростовой среды, антибиотиков, субстратов. В исследовании Makino et al. мышинные костномозговые клетки выращивались в среде IMDM с добавлением 20 % эмбриональной телячьей сыворотки, пенициллина (100 мкг/мл), стрептомицина (250 нг/мл), амфотерицина В (85 мкг/мл). Xu Wenrong

et al., человеческие МСК культивировались в среде DMEM с низким содержанием глюкозы, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 5 % лошадиной сыворотки, 100 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе. В. П. Шахов и др.[27] для культивирования мышинных МСК использовали среду DI-MEM, которая содержала 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 280 мг/л L-глутамина,  $10^{-6}$  М дексаметазона, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина. Концентрацию жизнеспособных клеток довели до  $(0,1-10) \times 10^6$ /мл. Культивирование человеческих МСК проводили в тех же условиях, заменив среду DI-MEM на DMEM. Кругляков и др. для получения крысиных МСК использовали среду  $\alpha$ MEM, содержащую 20 % эмбриональной телячьей сыворотки и 100 мкг/мл пенициллина или стрептомицина. В работе Матюкова клетки

костного мозга кролика культивировались в среде  $\alpha$ MEM с 10 % процентами сыворотки эмбрионов коров и гентамицина сульфата (50 мкг/мл).

Примечательна и тенденция к внедрению бесфидерных протоколов культивирования стволовых клеток, основанных на применении аналогов компонентов экстрацеллюлярного матрикса — Matrigel, к замене ксеногенных фидерного слоя и сыворотки человеческими, в том числе аутологичными. В частности культивирование стромальных клеток костного мозга для целей клеточной терапии в аутологичной сыворотке пациента [42]. Сами же МСК предлагается использовать как фидерный слой для культивирования других стволовых клеток [73].

### **ВЫДЕЛЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК КОЖИ IN VITRO**

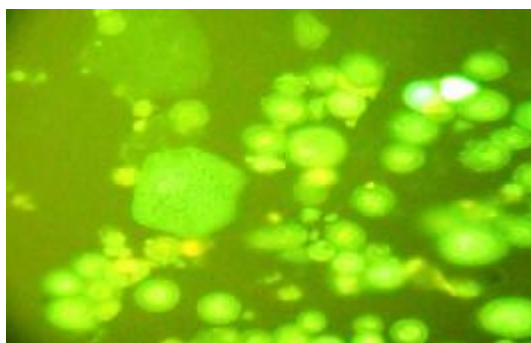
Современные клеточные технологии для восстановления кожного покрова, основаны на выращивании в культуре эпителиальных пластов кератиноцитов или фибробластов для приготовления живых эквивалентов кожи и их трансплантации на поражённые участки кожи.

Возможность применения для заживления ран культур клеток из аутологичных клеток кожи, выращенных *in vitro*, была продемонстрирована еще в сороковых годах прошлого века профессором зоологии

Р. В. Medawar, что положило начало новому направлению в создании биологических покрытий. Однако представленный тогда метод не позволял накапливать достаточного количества аутоклеток. Лишь в середине семидесятых годов J. Rhtiwald и Н. Green удалось усовершенствовать метод культивирования клеток эпидермиса (кератиноцитов, фибробластов), позволяющий примерно в течение 3 недель получать из биоптата кожи пласты клеток в 1000 раз превышающие размеры биоптата. Сущность метода заключалась в использовании в качестве субстрата облученных или обработанных митомицином С мышинных фибробластов линии 3Т3 или другими клетками менее безопасными для использования в трансплантации.

Дальнейшим прорывом в усовершенствовании метода культивирования явилось использование в качестве субстрата для роста кератиноцитов белков внеклеточного матрикса — покрытие коллагеном I и IV типов, что обеспечивало прикрепление и рост кератиноцитов в культуре (рис. 18).

В настоящее время разработаны питательные синтетические среды с добавлением факторов роста клеток (EGF, FGK), которые используются для приготовления культур.



*Рис. 18.* Колонии кератиноцитов различной степени дифференцировки, 12 дней *in vitro*. Клетки обработаны антителами к белкам внеклеточного матрикса базальной мембраны CD49f. Люминесцентная микроскопия,  $\times 400$

Перспективным направлением для получения культур кератиноцитов, является выделение и культивирование их предшественников и стволовых клеток кожи. Один из подходов — клонирование кератиноцитов по их пролиферативной активности с использованием различных факторов роста [57, 84].

#### **ВЫДЕЛЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ НЕЙРАЛЬНЫХ СПК**

Разрабатываются технологии получения культур нейральных СПК мозга человека и животных и устанавливаются их основные параметры жизнедеятельности и развития в условиях культуры. Подбираются оптимальные условия для суспензионного культивирования нейральных СПК человека и животных в виде «нейросфер» (рис. 19).

Нейросферы — это агрегаты недифференцированных предшественников нейральных стволовых клеток. Проводятся исследования некоторых биологических свойств нейральных СПК (фенотипы, пролиферативная активность, жизнеспособность). Определяются условия дифференцировки этих СПК при переводе их в монослойные культуры с использованием разных ростовых факторов [11, 35, 47].

## Система для наращивания и анализа НСК



Рис. 19. Схема дифференцировки нейральных СК

## ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ КЛОНИРОВАНИЕ

*Терапевтическое клонирование* — это искусственная продукция клеток и тканей, генетически идентичных исходным, с целью восстановления утраченных или разрушенных. Процесс клонирования делится на несколько стадий:

1. У женской особи берется яйцеклетка, из нее микроскопической пипеткой вытягивается ядро.
2. Затем в безъядерную яйцеклетку вводится ядро любой клетки (например, клетки кожи), содержащее ДНК клонируемого организма.
3. С момента слияния ядер начинается процесс размножения клеток и рост эмбриона.

Выращенные таким способом ткани генетически однородны тканям пациента и поэтому нет проблем несовместимости.

Показана возможность выделения и терапевтического использования стволовых клеток взрослого организма. Количество таких клеток в организме крайне мало, а методы их селекции и наработки их биомассы технологически очень сложны и еще на стадии разработки.

Как правило, СК, выделяемые из пуповинной и плацентарной крови, а также стволовые клетки взрослого организма получают в смеси с уже дифференцированными клетками. Для выделения стволовых клеток могут применяться методы удаления в культуре ткани дифференцированных клеток за счет индукции в них апоптоза, либо благодаря их связыванию с моноклональными антителами [34, 41, 46, 51, 71].

## ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

*Генная инженерия* — одна из клеточных инновационных технологий XXI века, при которой применяют принципы биологии и инженерного искусства к разработке функциональных заменителей тканей. Это получение изготовленного на заказ органа из тканей самого пациента. Тканевая инженерия соединяет две биотехнологии — клонирования и культивирования СК [57]. Исследования проводятся по следующей схеме:

- уточняются гены, контролирующие стволовость (т. е. способность самоподдержания в недифференцированном состоянии и способность переоплотиться в разные типы клеток организма после стимуляции);
- изучается способность СК к миграции в очаги повреждения;
- выявляются патологии стволовых клеток, приводящие к врожденным болезням;
- включение СК в поврежденную ткань и их дифференцировка;
- способность выделять белки-факторы роста и специфические регуляторные вещества — цитокины;
- изучается, как не до конца дифференцированная клетка (скажем, миобласт) может пройти обратный путь в нулевую дифференцировку, а затем преобразоваться в хрящ или кость (в зависимости от микроокружения, в которое она попадет) [36, 41, 51, 71, 83].

Все перечисленные выше технологии объединяются в бурно развивающееся новое направление медицины — регенеративную, или восстановительную медицину.

## РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА

**Регенеративная медицина** — это современное направление медицины, позволяющее восстанавливать нарушенные функции органов или целого организма путем стимуляции внутренних восстановительных процессов. Наиболее изученным направлением регенеративной медицины являются *клеточные технологии*. Этот метод поможет создать универсальные «донорские» культуры СК.

Такие культуры можно пересаживать любому пациенту, если удалить гены, которые делают клетку «чужеродной» для организма реципиента. Регенеративная медицина постепенно раскрывает секреты, как наш организм самообновляется и восстанавливается.

Определены 4 основные перекрывающиеся дисциплины, составляющие регенеративную медицину:

- 1) использование собственных генов и белков организма для восстановления здоровья (инсулин, интерферон, гормон роста, эритропоэтин);

- 2) использование для лечения СК (например, тканевая инженерия, трансдифференцировка СК одних тканей в клетки других тканей);
- 3) использование ЭСК (создание клеточных линий);
- 4) использование искусственных тканей и органов на основе новых материалов (например, искусственные клапаны сердца) [28, 44, 48, 52, 55, 56, 58].

## БАНК СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

**Банк стволовых клеток** — это сложное высокотехнологичное медицинское предприятие, производящее гарантированное, по определенным правилам, хранение клеточных образцов, обеспечивающее их последующее применение.

*Задачи банка СК:*

- заготовка пуповинной крови;
- выделение СК;
- исследование и подготовка их к хранению;
- длительное хранение клеток в условиях глубокого замораживания ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  — жидкий азот) (рис. 20).



Рис. 20. Забор пуповинной крови и подготовка СК для хранения в банке

Пуповинная кровь является богатым источником СК. Главное достоинство этих клеток (при «именном» хранении) — абсолютная генетическая идентичность тканям ребенка, из пуповинной крови которого они были получены, и частичная — в отношении организма матери и близких родственников.

В этом случае современные клеточные технологии и прежде всего использование стволовых клеток пуповинной крови можно считать естественной формой «биологического» медицинского страхования жизни и здоровья человека и членов его семьи.

Все этапы забора пуповинной крови освещены в протоколе:

- кем (Ф.И.О. врача-акушера), когда (час, день, месяц, год), где (номер роддома, палаты) был осуществлён забор крови;
- кем и когда был доставлен контейнер с пуповинной кровью в лабораторию;
- уникальный идентифицированный номер хранящейся крови;
- сроки хранения (дата начала хранения и по сегодняшний день);
- пути медицинского использования пуповинной крови; где, когда, кем, кому.

Юридические документы, необходимые для осуществления забора и хранения фетальных СК:

- 1) договор с Гемабанком;
- 2) письменное согласие роженицы;
- 3) медицинское заключение, разрешающее забор пуповинной крови;
- 4) протокол;
- 5) документ, свидетельствующий об оплате услуг, предоставляемых Гемабанком на хранение пуповинной крови.

Забор пуповинной крови осуществляется врачом-акушером. Используется отсечённая пуповина. В стерильных условиях вводят иглу в вену пуповины. Через несколько минут кровь упаковывают в специальный контейнер. И курьер доставляет контейнер в лабораторию. В лабораторию поступает герметичный стерильный пакет, содержащий пуповинную кровь и антикоагулянт. В лабораторных условиях из крови путём центрифугирования выделяют концентрат СК пуповинной крови. Оставшуюся плазму отправляют на анализы (ВИЧ, гепатит В и С, цитомегаловирус, герпес вирусы, токсоплазма и др. патогены). К концентрату СК добавляют криопротектор — вещество, препятствующее разрушению СК в условиях низкой температуры. Далее мешки помещают в жидкий азот при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$ . Каждому образцу присваивается уникальный идентифицированный номер. Важно также наличие пробирки-«спутника», которая используется при необходимости дополнительно протестировать образец крови без размораживания всех собранных СК. Таким образом, сбор пуповинной крови процедура абсолютно безопасная, быстрая, безболезненная. Сбор пуповинной крови не требует общей анестезии, проходит без физического контакта с матерью и ребёнком. Опыт хранения и успешного использования СК крови в мире насчитывает более 20 лет. Учёные предполагают, что сроки хранения составляют десятки лет, поэтому банки хранения пуповинной крови предлагают пожизненное хранение образцов.

*Противопоказания к забору пуповинной крови:*

- наследственные заболевания;
- острые воспалительные заболевания;

- вирусные инфекции и др. патогены;
- психические заболевания роженицы;
- наличие гемотрансфузии в анамнезе в течение года перед родами;
- тяжёлые роды и тяжёлое состояние женщины после родов, ибо акушерская бригада будет вынуждена спасти жизнь женщины и её ребёнка.

В настоящее время в мире существует развитая система банков пуповинной крови. Первый банк пуповинной крови был создан в 1993 г. в Нью-Йорке. С тех пор разными банками применялись различные практические подходы к сбору, обработке и хранению образцов пуповинной крови. Данные об имеющихся образцах пуповинной крови заносят в специальные регистры, доступные для международного медицинского сообщества. Подавляющее большинство этих банков являются частными и находятся на полной самоокупаемости [6, 55, 72].

В Республике Беларусь на базе Центра трансплантации органов и тканей 9-й городской клинической больницы г. Минска создан и функционирует банк пуповинной крови, имеющий в своих фондах более 200 образцов и постоянно пополняющийся. Образцы пуповинной крови отбираются на базе Республиканского научно-практического центра детской онкологии и гематологии и некоторых роддомов г. Минска. Эта услуга осуществляется на платной основе. Все образцы проходят тщательный бактериологический и вирусологический контроль. Клетки замораживаются и хранятся при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$  в жидком азоте. Это позволяет сохранять их практически без потерь не менее 20 лет. В случае заболевания (в списке показаний для лечения более 60 болезней) СК из пуповинной крови на 100 % подойдут ребёнку без риска несовместимости и отторжения. Это своего рода биологическая страховка ребёнка. СК можно использовать и при близкородственной трансплантации.

## **ТРАНСПЛАНТАЦИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ЛЕЧЕБНЫХ ЦЕЛЯХ**

Последние два десятилетия характеризуются повышенным интересом научной и медицинской общественности к возможностям клеточной терапии, которая, согласно наиболее смелым прогнозам, будет являться «визитной карточкой» медицины XXI века. Клеточная терапия — это использование живых клеток различного происхождения, которые при введении в организм пациента способны к активному функционированию, результатом чего является улучшение или модификация существующей функции органа или ткани, либо восстановление или замена утраченной функции.



## ЛЕЙКОЗЫ

В ходе осуществления этого лечебного мероприятия проводятся следующие операции:

- выделение СК из костного мозга больного лейкозом;
- размножение СК в культуре ткани;
- консервация СК в жидком азоте;
- уничтожение опухолевых (лейкозных) клеток костного мозга облучением или цитостатиками;
- трансплантация сохраненных СК в костный мозг пациента.

Положительный исход трансплантации зависит от того, насколько успешно будут выделены именно СК, а не бластомные клетки костного мозга. С целью очищения пунктата костного мозга от бластомных клеток применяются метод индукции апоптоза в бластомных клетках, уничтожение этих клеток моноклональными антителами и др.

Следует иметь в виду, что таким же способом пробуют бороться и со злокачественными опухолями других локализаций путем введения в пораженный опухолью орган, подвергшийся облучению и (или) лечению цитостатиками, культуры СК больного, полученных из его костного мозга [1, 4, 8, 24, 55].

## ОЖОГИ

Ожоги являются одной из наиболее распространенных травм человека. В настоящее время в России больные с ожогами составляют 20 % от всех травмированных больных. Летальность от ожоговой болезни доходит до 11 %. Кожа обладает высокими регенеративными возможностями, однако при обширных термических травмах, трофических язвах, сопровождающихся утратой значительной части кожи, регенеративных возможностей кожи бывает недостаточно. Для решения проблемы своевременного и быстрого закрытия раневых поверхностей, широкое применение в клинической практике получил метод аутодермотрансплантатов — пересадка лоскутов кожи из неповреждённых участков. Основным недостатком аутодермотрансплантатов является обширная кожная рана в месте забора лоскута и невозможность применения при обширных поражениях более 30–40 % поверхности тела по причине дефицита донорских ресурсов. В связи с этим разработка альтернативных методов закрытия обширных ожоговых поверхностей остается одним из актуальных вопросов комбустиологии [57].

Суспензия культивируемых клеток пациента или донора, или пласты кожи человека, выращенные вне организма и состоящие из кератиноцитов и/или фибробластов, получают в лабораторных условиях и могут быть использованы для лечения ожоговых больных.

Помимо закрытия ожоговых кожных дефектов, данная методика может применяться при лечении трофических язв, в косметологии, а также для тестирования медицинских и косметических препаратов при проведении испытаний внешних воздействий на кожу.

В настоящее время актуальным и перспективным является применение клеточных технологий в медицине, которые уже хорошо развиты в некоторых странах и широко нашли своё применение в разработке медицинских препаратов для восстановления клеточных покровов. Разработан ряд лечебных препаратов, применяемых в клинической практике на основе культур клеток.

В настоящее время химической промышленностью разработано множество коммерческих препаратов для закрытия раневых поверхностей. Как правило, это мембраны, состоящие из полимерной основы.

По устойчивости синтетические покрытия можно разделить на биодеградирующие (рассасывающие) состоящие из природных полимеров (желатина, коллагена, хитозана) и биоинертные, состоящие из синтетических материалов. Ведутся работы по созданию синтетических и природных покрытий содержащих живые кератиноциты и фибробласты [42, 74].

### **ОЖОГИ И ТРАВМЫ РОГОВИЦЫ**

Имеются данные о возможности восстановления поврежденной роговицы глаза ожогом или травмой за счет применения стволовых клеток пациента, полученных из слизистой ротовой полости, кожи, жировой ткани, костного мозга. Отдаленные результаты таких операций пока изучаются.

В литературе приводятся данные о возможности практического применения стволовых клеток в лечении заболеваний сетчатки [69]. Высказывается мнение о том, что СК имеют большой потенциал в лечение глазных болезней, характеризующихся необратимой потерей клеток, таких как глаукома и дегенерация фоторецепторов.

### **ЗАБОЛЕВАНИЯ ПЕЧЕНИ**

Имеются данные экспериментальных исследований, посвященных возможности лечения цирроза печени при помощи трансплантации в печень мезенхимальных стволовых клеток костного мозга. Результаты экспериментов противоречивы: с одной стороны, якобы, зарегистрированы случаи трансформации стволовых клеток в гепатоциты, а с другой — трансплантация стволовых клеток приводила к развитию аутоиммунного гепатита или к их трансформации в фибробласты и прогрессированию цирроза [9, 12, 25, 67]. Известно, что ГСК пуповинной

крови человека способны дифференцироваться в гепатоциты. Эта способность может быть широко использована в лечении различных заболеваний печени. Показано, что трансплантированные крысам в селезенку мононуклеары пуповинной крови человека, трансформированные геном зеленого флуоресцентного белка, мигрируют в печень крыс после частичной гепатэктомии и приобретают фенотип гепатоцитов, синусоидных клеток и холангиоцитов [36].

## САХАРНЫЙ ДИАБЕТ

Проблема поиска новых подходов к лечению сахарного диабета I типа остается актуальной задачей современной медицины. Перспективной альтернативой существующих методов заместительной терапии сахарного диабета может стать трансплантация клеток-предшественниц эндокриноцитов поджелудочной железы. Их применение поможет устранить причину возникновения сахарного диабета I типа — дефицит  $\beta$ -клеток островков Лангерганса, что позволит пациентам отказаться от введения экзогенного инсулина. Главной проблемой в разработке таких методов лечения является то, что до сих пор не идентифицированы СК эндокриноцитов. Предполагается, что эти клетки могут находиться среди клеток эпителия протоков поджелудочной железы или среди ацинарных клеток. Не исключено, что СК эндокриноцитов локализуются внутри самих островков. Одним из подходов для идентификации может быть выявление этих клеток по специфическим маркерам (C-kit или CD117) [56].

Трансплантация культуры клеток является несложной хирургической процедурой, упрощенной во многих случаях до обычной инъекции, а пересадка органа на сосудистых связках — сложнейшее хирургическое вмешательство, требующее проведения интенсивной пред- и послеоперационной терапии. Разработан иммуноизолирующий метод, позволяющий эффективно изолировать пересаженные клетки от иммунной системы больного (табл.). Суть метода заключается в том, что суспензированная в агарозном геле культура клеток, помещается в контейнер, представляющий собой полупроницаемую мембрану, который с помощью хирургических методик внедряется в организм больного, и эффективно изолирует пересаженные клетки от иммунной системы хозяина.

*Таблица*

**Иммуноизолирующие методы**

<b>Метод</b>	<b>Форма мембраны</b>	<b>Материал мембраны</b>
Сосудистый перфузионный	Трубка	Акрилат
Макроинкапсуляция	Сфера, конволюта, трубка	Полимерные материалы: полиуретан, полиамид

Микроинкапсуляция	Микрокапсула	Альгинат-поолиоз
-------------------	--------------	------------------

На 2-й кафедре хирургических болезней БГМУ был разработан контейнер, изготовленный на основе производных полиамида и представляющий собой полупроницаемую мембрану с размерами пор 1–2 мкм в диаметре, имеющий длину 12–15 мм и ширину 4–5 мм, что создает условия для достаточной диффузии между кровью и полостью капсулы, а также исключает возможность развития лимфоцитарной и макрофагальной реакции на культуру клеток [49, 56]. Предварительное культивирование ткани может продлевать ее выживание в организме хозяина при последующей трансплантации. Это связано с элиминацией клеток иммунного ответа, а также за счет снижения экспрессии антигенов первого класса главного комплекса гистосовместимости. Место введения культур клеток — сосудистое русло, является иммунологически выгодной зоной трансплантации. Наиболее благоприятными зонами трансплантации являются сосуды предплечья или глубокая артерия бедра. Исследования свидетельствуют, что уже через 2 недели в просвете изолированного сосуда развивается достаточно выраженная капиллярная сеть, способствующая нормальному функционированию трансплантата [48].

### **ИНФАРКТ МИОКАРДА**

Имеются положительные результаты применения стволовых клеток или их производных для лечения последствий инфаркта миокарда и хронической сердечной недостаточности, полученные в результате экспериментальных исследований и клинических испытаний. С целью регенерации миокарда, а также для стимуляции ангиогенеза в миокарде больных, ведутся исследования по применению эмбриональных стволовых клеток или мезенхимальных стволовых клеток костного мозга пациента.

В целях доказательства позитивных результатов таких экспериментов (трансдифференцировка СК в кардиомиоциты) применялись флюоресцентные моноклональные антитела, которые, благодаря способности связываться с рецепторным аппаратом кардиомиоцитов, показывали, что в зоне инфаркта появляются новые кардиомиоциты, образовавшиеся из трансплантированных СК.

Тканевая инженерия миокарда призвана улучшить эффективность клеточной кардиомиопластики. Ученые считают, что трансплантация тканевой конструкции может быть более эффективна, чем обычное введение взвеси клеток. Возможно, что тканеинженерные конструкции, состоящие из кардиомиоцитов или незрелых прогениторных клеток,

нанесенных на биodeградируемый материал, будут иметь преимущество в плане электромеханической интеграции с миокардом хозяина.

Клеточная кардиомиопластика включает в себя три основных подхода:

1. Проведение локальной терапии цитокинами, которые стимулируют дифференцировку эндогенных СК сердца в кардиомиоциты.

2. Введение колониестимулирующих факторов для мобилизации выхода СК костного мозга, которые затем достигают поврежденного участка миокарда и стимулируют его восстановление.

3. Трансплантация СК.

Для этого могут применяться: эмбриональные СК, фетальные СК, эндотелиальные предшественники, клетки-сателлиты поперечно-полосатой мускулатуры, мезенхимальные СК, гемопоэтические СК, эндогенные СК сердца (рис. 21) [71, 75, 82, 83].

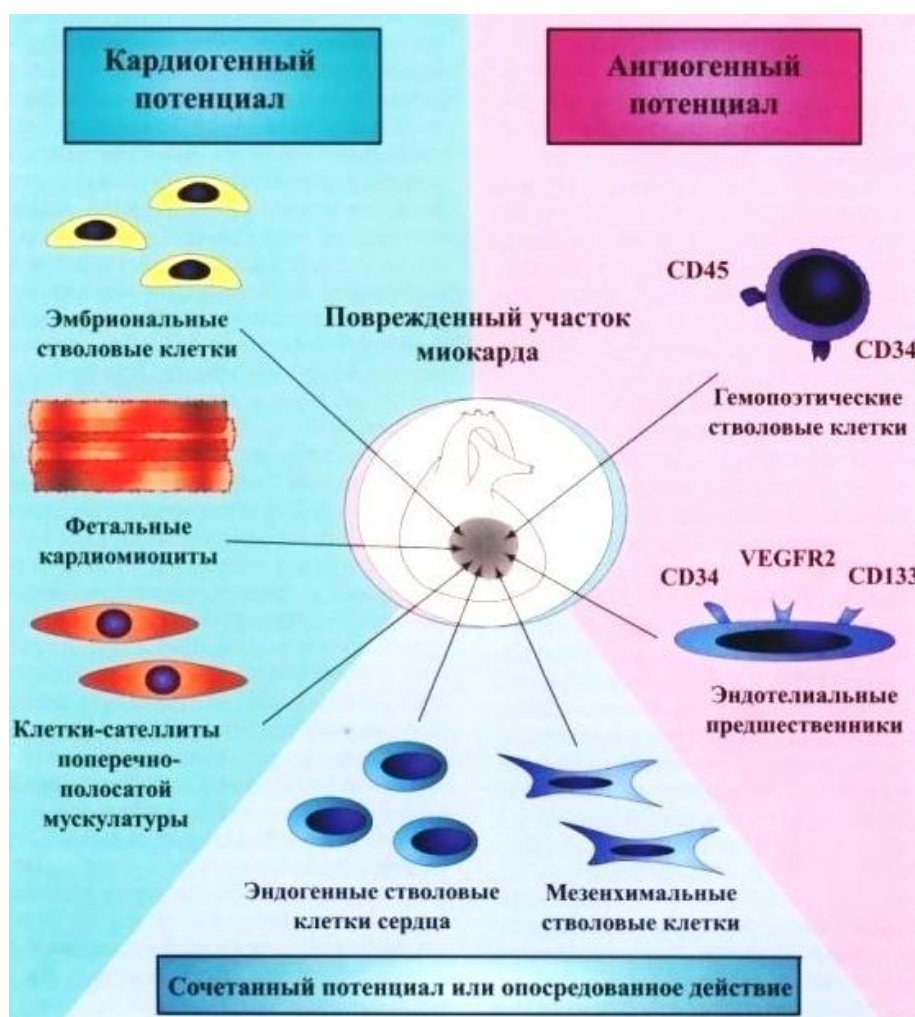


Рис. 21. Клетки, трансплантируемые при инфаркте и их лечебный потенциал

В настоящее время большинство работ в области создания тканевых эквивалентов миокарда находятся на стадии эксперимента *in vitro*. Уже

получены многослойные конструкции на различных носителях, способные к спонтанному сокращению и проявляющие более или менее стабильную электрическую активность [10, 19, 20, 55, 71].

Основной сложностью создания тканеинженерных конструкций миокарда является отсутствие надежного клеточного источника. Предлагается использовать зрелые и фетальные кардиомиоциты [10, 16, 19, 22, 44], эмбриональные стволовые клетки, преддифференцированные в кардиомиобласты [5, 40, 53, 83, 84].

### **НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

К числу заболеваний ЦНС, при которых изучается возможность применения с лечебной целью СК, относят болезнь Паркинсона, мозговой инсульт, боковой амиотрофический склероз, ранние формы болезни Альцгеймера, травматические поражения нервной системы. Многочисленные исследования в области нейральных стволовых клеток (НСК) поставили принципиально новые задачи выяснения роли этих клеток в процессах, протекающих в мозге в норме и при патологии [6, 11, 37]. Выделение НСК из различных участков эмбрионального и зрелого мозга, получение долгоживущих культур, позволили изучить возможности их нейротрансплантации для клеточной и генной терапии некоторой экспериментальной патологии мозга и подойти к клиническим исследованиям. Появились новые подходы к лечению болезней, считавшихся ранее неизлечимыми (болезнь Паркинсона, Альцгеймера и др.) [11, 28].

Перспективы применения НСК в клинике сводятся к двум направлениям:

- разработка способов управляемой активации собственных НСК;
- использование в трансплантации предварительно культивированных НСК.

Повреждения мозга, характеризующиеся диффузной дегенерацией и гибелью нейронов, широко распространены в клинике нервно-психических заболеваний и являются типичным постреанимационным осложнением. Одной из моделей, позволяющих получить подобную картину травмы мозга на животных, является гипоксическая гипоксия. Эффекты гипоксии хорошо изучены, что делает ее удобной моделью для проверки возможных методов лечения подобных заболеваний [41, 65].

В экспериментах и, в некоторых случаях, при клинических испытаниях предпринимались попытки трансплантации СК или их производных для лечения последствий инсультов, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, бокового амиотрофического склероза. Также

проводится аутогенная трансплантация ГСК пациентам при тяжелых прогрессирующих формах рассеянного склероза (рис. 22).

Метод состоит из нескольких этапов:

- мобилизация ГСК цитокинами в периферический кровоток;
- выделение ГСК (лейкофорез);
- ингибирование иммунной системы;
- аутотрансплантация ГСК [26, 37].

Имеются положительные результаты клинических испытаний, требующие проведения дальнейших исследований и клинических наблюдений [21, 47, 59, 62, 68].

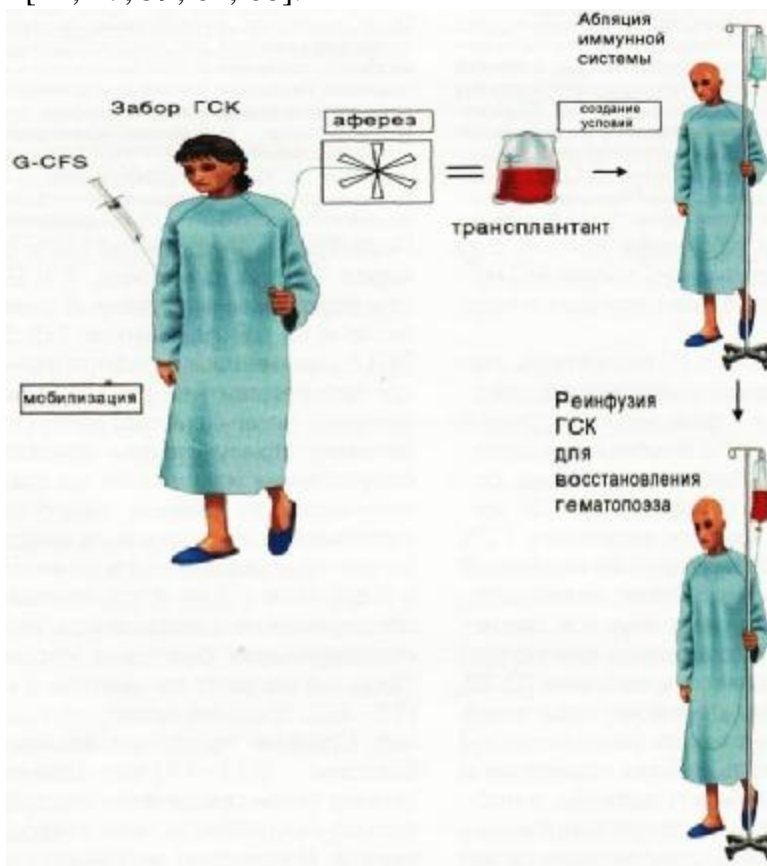


Рис. 22. Схема аутотрансплантации ГСК при рассеянном склерозе

Генно-клеточная терапия представляет собой новый этап в лечении пациентов с различными заболеваниями ЦНС. Как наиболее эффективная терапия для лечения нейродегенеративных заболеваний рассматривается генетическая модификация клеток пуповинной крови для оптимальной доставки нейропротекторных факторов и факторов роста в области нервной системы, подверженные дегенерации в процессе заболевания. Экспериментальные исследования показывают, что генетически модифицированные клетки имеют огромный потенциал для доставки терапевтических генов в ЦНС с целью структурного и функционального

восстановления мозга после нейротравм, ишемических инсультов и при различных нейродегенеративных заболеваниях [76]. Показано, что локальная доставка в область травмы спинного мозга гена глиального нейротрофического фактора при помощи аденовирусного вектора предотвращает ретроградную атрофию кортикоспинальный мотонейронов и стимулирует восстановление двигательной функции [64]. Экспериментальные исследования показали, что локальное введение МСК оказывает стимулирующий эффект на процессы регенерации в дегенеративно измененной хрящевой ткани межпозвоночных дисков [87].

### **ПЕРЕЛОМЫ КОСТЕЙ**

В последние годы разработано несколько экспериментальных методик по применению СК костного мозга для лечения переломов костей с замедленной консолидацией. Стволовые клетки применяют в комбинациях с органическими и минеральными матрицами, а также с использованием факторов роста в качестве стимуляторов остеорепарации.

### **«РЕВИТАЛИЗАЦИЯ» (ОМОЛОЖЕНИЕ) ОРГАНИЗМА**

Попытки применить стволовые клетки (эмбриональные и фетальные) для оздоровления организма, а также в гериатрии предпринимаются уже достаточно давно в большом количестве клиник во многих странах мира. Однако, кроме рекламы этих клиник, обещающих «сказочные» результаты омоложения и оздоровления организма, серьезных научных разработок в этой области практически не имеется. В некоторых клиниках, например, в Швейцарии (клиника ревитализации Лемана) в целях омоложения организма пациентов применяют эмбриональные клетки животных (овец).

### **ПРОБЛЕМЫ, ВОЗНИКАЮЩИЕ ПРИ ВЫДЕЛЕНИИ, КУЛЬТИВИРОВАНИИ И ТРАНСПЛАНТАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

Будущее клеточной терапии и трансплантологии, а, возможно, и медицины в целом связано с использованием СК, применяемых с целью замещения структурной и функциональной недостаточности различных органов. Использованию ЭСК в клеточной терапии многих заболеваний препятствует ряд проблем:

1. Технические трудности в получении чистой линии человеческих ЭСК.
2. Недостаток информации об индукции их дифференцировки *in vitro*.
3. Существование риска канцерогенеза.



4. Существуют возможности контаминации микроорганизмами (вирусами, бактериями, микоплазмой и др.) [8, 18, 41, 54, 55, 66].

Возможность получения СК из плацентарной или пуповинной крови (мультипотентных СК) осложняется необходимостью выделять именно СК из получаемой таким образом клеточной массы.

На сегодняшний день происходит оптимизация и стандартизация методов в трансплантологии, вплоть до поиска возможности замены одного вида трансплантации другим с тем, чтобы, получая идентичный (или сопоставимый) результат максимально снизить риск для пациента и увеличить эффективность клеточной терапии.

Факторы, ограничивающие использование СК взрослого организма:

- СК обнаружены не во всех типах тканей взрослого организма;
- после получения СК от пациента необходимо увеличить их количество для проведения терапии;
- если заболевание пациента имеет генетическую природу, то СК тоже будут поражены;
- СК взрослого организма делятся не так быстро, как СК плода;
- из одной линии СК взрослого организма можно получить не более 3–4 типов тканей.

Существует достаточно много проблем технического и этического характера, возникающих при работе с СК. Перечислим некоторые из них:

- терапевтическое и репродуктивное клонирование запрещено законом во многих странах мира. Из европейских стран терапевтическое клонирование разрешено только в Великобритании;
- получение фетальных стволовых клеток вызывает много этических вопросов. В ряде стран запрещено использование абортивного материала для медицинских целей;
- получение «пуповинных» стволовых клеток может быть связано с ранним пережатием пуповины, что наносит ущерб родившемуся ребенку;
- применение колониестимулирующих факторов для массивного выброса в периферическую кровь гемопоэтических и мезенхимальных стволовых клеток может вызывать излишнюю пролиферацию костного мозга, что может быть чревато его малигнизацией;
- иммунологические проблемы отторжения [42, 46, 76].

#### **РАЗРАБОТКА КРИТЕРИЕВ БИОБЕЗОПАСНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СК КОСТНОГО МОЗГА**

Было отмечено укорочение теломер МСК при их длительном культивировании *in vitro*. Вместе с тем было обнаружено, что активность теломеразы у МСК жировой ткани выше, чем у МСК костного мозга.

Для достижения возможности длительного культивирования МСК *in vitro* предпринимались многочисленные попытки использования трансфекции «теломеразными» генными конструкциями, например, hTERT. Трансдуцированные МСК не меняли фенотип, кариотип и дифференцировочный потенциал в течение 2–3 лет. Однако позднее было показано, что иммортализация нормальных клеток человека теломеразными конструкциями, несёт в себе риск неопластической трансформации. Таким образом, можно предположить, что протоколы по иммортализации МСК не имеют будущего с точки зрения их практического применения в клинике, что обусловлено высоким риском онкогенной трансформации, индуцированной теломеразными конструкциями.

Что касается возможности спонтанной трансформации МСК *in vitro*, то этот феномен отмечается при длительном их культивировании (более двух месяцев) в 50 % образцов. Таким образом, длительное культивирование МСК нецелесообразно, так как оно ассоциировано с высоким риском канцерогенеза. Все культуры МСК, предназначенные для клинического применения, необходимо кариотипировать на предмет исключения хромосомных мутаций. Следует также учитывать отмеченные опасности при создании протоколов приготовления культур МСК *in vitro*.

В настоящее время разрабатываются генно-инженерные подходы в клеточной терапии МСК, чему способствует то, что МСК могут быть свободно выделены от будущего реципиента, генномодифицированы и культивированы перед аутотрансплантацией. Такой подход исключает опасность осложнений ксенотрансплантации, а также обходит ограничения и риск связанные с непосредственной доставкой пациенту генетически восстановленного материала с патоген-ассоциированными векторами [73].

Результаты трансплантации СК в качестве лечебного мероприятия при ряде заболеваний человека пока еще исследуются, отдаленные результаты которого могут иметь и негативные последствия. Это, конечно, не означает, что исследования лечебных эффектов трансплантации стволовых клеток не должны производиться. В лечебную практику трансплантация стволовых клеток может войти только после ее тщательного лабораторного изучения, исключающего все возможные негативные последствия этой процедуры для здоровья людей.

Остановимся кратко на тех серьезных проблемах трансплантации стволовых клеток, с которыми приходится сталкиваться экспериментаторам и клиницистам. Представления о том, что трансплантируемые стволовые клетки не вызывают иммунного ответа организма не соответствуют действительности. Дело в том, что СК действительно не экспрессируют на

своей клеточной мембране молекул главного комплекса гистосовместимости. Благодаря этому обстоятельству они не подвергаются атакам Т-киллеров.

Однако клетки, не имеющие рецепторного аппарата главного комплекса гистосовместимости, подвергаются разрушению со стороны других иммунных клеток — естественных киллеров (NK-клеток), которые играют ведущую роль в противоопухолевой защите организма и реагируют именно на клетки, лишенные рецепторов главного комплекса гистосовместимости. Поэтому, при трансплантации стволовых клеток приходится нейтрализовать NK-клетки некоторыми химическими веществами, в частности, индометацином.

Основные проблемы клеточной трансплантации:

- определение оптимального вида клеточного материала (фенотип и специализация клеток, культивирование или свежее выделение, видовая принадлежность);
- количество (доза) клеток на одно введение и на курс лечения;
- путь и метод введения;
- механизм действия пересаженных клеток;
- безопасность (самой процедуры трансплантации, отсутствие побочных эффектов после неё, иммунологическая и онкогенная безопасность);
- определение клинических показаний и противопоказаний, тщательный отбор пациентов;
- недостаточность законодательной базы и правовой регуляции.

### **РОЛЬ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ РАКЕ И ЛЕЙКОЗАХ**

Для поддержания функции ткани/органа на необходимом для организма уровне восстановление утраченных клеток должно не нарушать общую архитектуру. Клетки, вступающие в пролиферативную фазу жизненного цикла, более чувствительны к внешним мутационным воздействиям по сравнению с клетками в фазе G<sub>0</sub> и в части случаев могут оказаться дефектными и перестать воспринимать сигналы регуляции нормального роста. Нарушение деления клеток может привести к появлению потомства, которое не подчиняется определенному порядку и не обладает необходимыми механизмами репарации ДНК. Размножение такой клетки/клеток может привести к появлению патологического клона значительного размера и появлению новообразования. Именно так обстоит дело со злокачественными опухолями, которые растут быстрее или медленнее в зависимости от ритма деления и продолжительности жизни составляющих их клеток.

Несмотря на клональное происхождение подавляющего большинства злокачественных опухолей, одной из наиболее известных особенностей

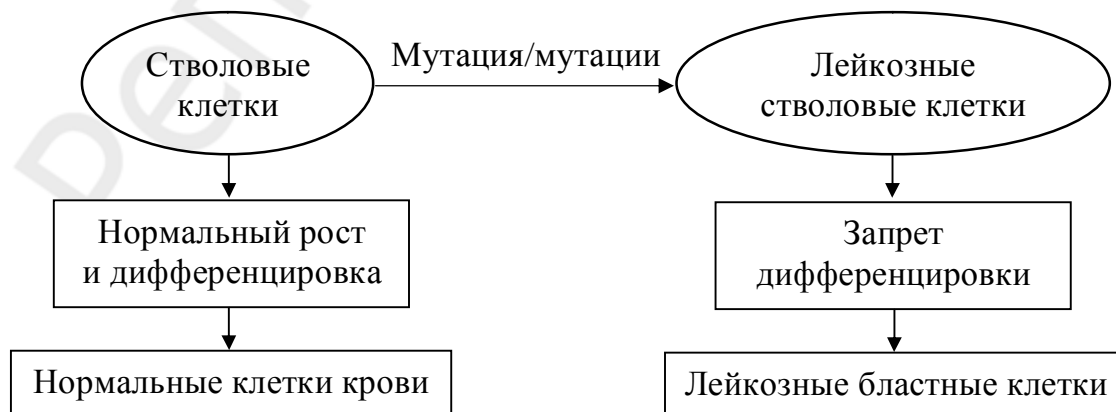
первичных опухолей является значительная клеточная гетерогенность. И хотя сама эта характеристика многократно описана, тем не менее, причины, по которым единичная трансформированная клетка дает начало многим клеточным типам, составляющим опухоль, остаются неясными. Известно, что нормальные СК обладают потенциалом к самообновлению популяции, к экстенсивной пролиферации и к дифференцировке в различные клеточные типы. Исходя из этого, легко представить, что даже минимальные отклонения от этих характеристик могут привести к формированию феномена злокачественности. И действительно, на сегодняшний день получены доказательства участия СК в патогенезе некоторых видов злокачественных опухолей, в частности, миелолейкоза. Лейкозные стволовые клетки (ЛСК) обладают многими характеристиками нормальных стволовых гемопоэтических клеток. Популяция злокачественных стволовых клеток может появляться двумя путями [1, 3, 14, 42, 55]:

- нормальные гемопоэтические стволовые клетки оказываются прямой мишенью мутаций, приводящих к появлению фенотипа ЛСК;
- мутации в более дифференцированных клетках (КП) могут приводить к появлению характеристик стволовых клеток.

Вне зависимости от происхождения, возникающие тем или иным образом клетки, обладают уникальными чертами стволовых раковых клеток.

Среди стволовых клеток соматических тканей лучше всего изучены СК гемопоэза [1, 24]. Поэтому неудивительно, что феномен стволовых клеток опухоли подробнее всего изучен по данным огромного массива исследований лейкозов *in vivo* и *in vitro*.

Идентифицированные при острой и хронической формах миелолейкоза, при остром лимфобластном лейкозе ЛСК обладают способностью к самообновлению популяции, пролиферации и дифференцировке. Характерная для нормального гемопоэза иерархическая структура построения ткани сохраняется и в лейкемической популяции клеток (рис. 23). Опухоль из потомства пролиферирующих СК может развиваться в любом возрасте, а уровень дифференцировки опухолевых клеток зависит от стадии



дифференцировки, на которой проявились онкогенные воздействия.

*Рис. 23. Механизм возникновения ЛСК*

Если запрет созревания происходит на ранней стадии дифференцировки клеточной линии, то развивается опухоль низкой степени дифференцировки. Если нарушение происходит позже, то и уровень дифференцировки опухолевой ткани выше. Изменения, ведущие к развитию рака, могут происходить в клетках, сохраняющих потенциал деления, например, в клетках, лежащих выше базального слоя мембраны кожи или слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта.

Однако при функциональной сохранности ткани происходит физиологическое удаление нормальных и трансформированных клеток верхних слоев ороговевающего и неороговевающего эпителия. Следовательно, для развития онкологического заболевания необходимо, чтобы трансформированные клетки оставались внутри организма.

ЛСК начинают процесс дифференцировки, но из-за запрета дифференцировки и неэффективности регуляторных воздействий происходит накопление клеток на промежуточной стадии развития.

Такие клетки получили название лейкозных бластных клеток и биологически отличаются от ЛСК. В результате накапливается генетическая нестабильность и гетерогенность популяции, в которой одновременно сосуществуют лейкозные стволовые и бластные клетки.

В настоящее время детальные молекулярные механизмы трансформации гемопоэтических стволовых клеток ясны не до конца. В большинстве случаев происходит нарушение способности к самоподдержанию популяции, увеличение пролиферативного индекса и доли клеток, выходящих из фазы G<sub>0</sub>.

Изменение частоты самообновления популяции стволовых клеток, т. е. нарушение нормального ритма самообновления ткани может приводить к появлению/накоплению клеток с патологическими характеристиками. Однако нельзя экстраполировать данные о нормальных и трансформированных гемопоэтических стволовых клетках на другие виды рака.

Таким образом, анализируя вышеизложенные данные, можно констатировать тот факт, что в медицине наибольшее внимание уделяется использованию СК костного мозга (кроветворных и стромальных клеток), жировой ткани, пуповинной крови как наиболее обогащенных стволовыми клетками популяции и наиболее доступный источник их получения.

Выращивая стромальные стволовые клетки и получая достаточно большие их количества, можно задавать направление их

дифференцировки. Эти клетки способны дифференцироваться в клетки хрящевой, костной, мышечной, жировой тканей, ткани печени и кожи. В ближайшее десятилетие это направление медицинской науки может стать основой для терапии наиболее распространенных заболеваний сердечно-сосудистой и центральной нервной системы, опорно-двигательного аппарата. Плюри- и мультипотентность СК делает их идеальным материалом для использования в трансплантационных методах клеточной и генной терапии [36, 43, 44, 50, 51, 67]. Успехи клеточной биологии и смежных дисциплин создают основу для развития новых подходов в лечении различных заболеваний с использованием клеточных технологий.

Репозиторий БГМУ

## ЛИТЕРАТУРА

1. *A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages* / K. Akashi [et al.] // *Nature*. 2000. N 404. P. 193–195.
2. *Ding, S. A role of chemistry in stem cell biology* / S. Ding, P. G. Schultz // *Nature Biotechnology*. 2004. Vol. 22. P. 833–840.
3. *Bhatia, M. AC133 expression in human stem cells* / M. Bhatia // *Leukemia*. 2001. Vol. 15. P. 1685–1688.
4. *Akashi, K. Developmental Biology of Hematopoiesis* / K. Akashi, I. L. Weissman ; ed. by L. I. Zon. New York : Oxford University Press, 2001.
5. *Alperin, C. Polyurethane films seeded with embryonic stem cell-derived cardiomyocytes for use in cardiac tissue engineering applications* / C. Alperin, P. W. Zandstra, K. A. Woodhouse // *Biomaterials*. 2005. Vol. 26. P. 7377–86.
6. *Animal cell technology : basic and applied aspects* / ed. by K. Funatsu [et al.]. Boston, 2004. Vol. 8.
7. *5-Azacytidine induces changes in electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells* / B. Balana [et al.] // *Cell Res*. 2006. Vol. 16, N 12. P. 949–960.
8. *Aversa, F. Hematopoietic stem cell transplantation from alternative sources in adults with high-risk leukemia* / F. Aversa, Y. Reisner, M. F. Martelli // *Blood cells, molecules, diseases*. 2004. Vol. 33. P. 294–302.
9. *B-cell differentiation from a human pancreatic cell line in vitro and in vivo* / D. Dufayet de la Tour et al. // *Mol. Endocrinol*. 2001. Vol. 15. P. 476–483.
10. *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium* / D. Ortic [et al.] // *Nature*. 2001. N 410. P. 701–705.
11. *Cell-intrinsic differences between stem cells from different regions of the peripheral nervous system regulate the generation of neural diversity* / S. Bixby [et al.] // *Neuron*. 2002. Vol. 35. P. 643–656.
12. *Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets* / N. Lumelsky [et al.] // *Science*. 2001. N 292. P. 1145–1148.
13. *Ding, S. A role of chemistry in stem cell biology* / S. Ding, P. G. Schultz // *Nature Biotechnology*. 2004. Vol. 22. P. 833–840.
14. *Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation* / K. M. Choi [et al.] // *J. Biosci. Bioeng*. 2008. Vol. 105. P. 586–94.
15. *Embryonic stem cells lines derived from human blastocysts* / J. A. Thomson [et al.] // *Science*. 1998. Vol. 282. P. 1145–1147.
16. *In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue* / S. Bonner-Weir [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. Vol. 97. P. 7999–8004.
17. *Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice* / B. Soria [et al.] // *Diabetes*. 2000. Vol. 50. P. 521–533.
18. *Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts* / A. Bongso [et al.] // *Hum. Reprod*. 1994. P. 2110–2117.
19. *In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine* / P. Antonitsis [et al.] // *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surger*. 2007. Vol. 7. P. 593–597.
20. *Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion* / Y. Jang [et al.] // *Nat. Cell Biol*. 2004. Vol. 6. P. 532–539.
21. *Menasche, P. Cell transplantation for the treatment of heart failure* / P. Menasche // *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2002. № 14 (2). P. 157–166.

22. *Modulation of gene expression in neonatal rat cardiomyocytes by surface modification of polylactide-co-glycolide substrates* / D. A. Brown [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. 2005. Vol. 74. P. 419–29.
23. *Pittenger, M. Mesenchymal stem cells of human adult bone marrow* / M. Pittenger, D. R. Marshal. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. P. 349–374.
24. *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells* / M. Al-Hajj [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. Vol. 100. P. 3983–3988.
25. *Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo* / E. Lagasse [et al.] // Nat. Med. 2000. Vol. 6. P. 1229–1234.
26. *Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans* / B. E. Strauer [et al.] // Circulation. 2002. Vol. 106. P. 1913–1918.
27. *Rossant, J. Stem cells from the mammalian blastocyst* / J. Rossant // Stem Cells. 2001. Vol. 19, N 6. P. 477–482.
28. *Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system* / K. K. Johe [et al.] // Genes Dev. 1996. Vol. 10. P. 3129–3140.
29. *Stepwise reprogramming of B cells into macrophages* / H. Xie [et al.] // Cell. 2004. Vol. 117. P. 663–676.
30. *Lakshmipathy, U. Stem cell plasticity* / U. Lakshmipathy, C. Verfaillie // Blood Rev. 2005. Vol. 19. P. 29–38.
31. *Streckfuss-Bomeke, K. Comparative study of human-induced pluripotent stem cells derived from bone marrow cells, hair keratinocytes and skin fibroblasts* / K. Streckfuss-Bomeke, F. Wolf, A. Azizian // European heart J. 2012. Epub. ahead of print.
32. *Survival and differentiation of adult eural progenitor cells transplanted to the adult brain* / F. H. Gage [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. Vol. 92. P. 1879–1883.
33. *Treatment of severe systemic lupus erythematosus with high-dose chemotherapy and haemopoietic stem-cell transplantation : a phase I study* / A. E. Traynor [et al.] // Lancet. 2000. Vol. 356. P. 7017–7027.
34. *Transdifferentiation in neoplastic development and its pathological implication* / Z. Zhang [et al.] // Histol. Histopathol. 2001. Vol. 16. P. 1249–1262.
35. *Turning blood into brain : cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow* / E. Mezey [et al.] // Science. 2000. Vol. 290. P. 1779–1782.
36. *Возможные направления дифференцировки мононуклеаров пуповинной крови человека в регенерирующей печени крыс* / Д. И. Андреева [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2013. Т. 8, № 3. С. 95–100.
37. *Станкевич, Г. С. Аутогенная трансплантация ГСК при тяжелых прогрессирующих формах рассеянного склероза* / Г. С. Станкевич // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2005. № 1. С. 29–31.
38. *Аутологичные стволовые клетки. Экспериментальные исследования и перспективы клинического применения* / под ред. В. А. Ткачука. М. : Литтерра, 2009. 448 с.
39. *Сравнительное исследование влияния дермальных фибробластов и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, заключенных в коллагеновый гель, на регенерацию десны* / А. А. Бармашева [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2013. Т. 8, № 3. С. 35–43.
40. *Биология стволовых клеток и клеточные технологии* / под ред. М. А. Пальцева. М. : Медицина, Шико, 2009. Т. 2. С. 75–96.
41. *Введение в методы культуры клеток, биоинженерии органов и тканей* / В. П. Шахов [и др.]. Томск, 2004. 385 с.



42. *Вермель, А. Е.* Стволовые клетки : общая характеристика и перспективы применения в клинической практике / А. Е. Вермель // Клиническая медицина. 2004. № 1. С. 5–11.
43. *Викторов, И. В.* Мультипотентные стволовые и прогениторные клетки обонятельного эпителия / И. В. Викторов, Г. В. Сухих // Вестник РАМН. 2002. № 4. С. 24–30.
44. *Викторов, И. В.* Стволовые клетки мозга млекопитающих : биология стволовых клеток *in vitro*, *in vivo* / И. В. Викторов // Изв. АН. Сер. Биол. 2001. № 6. С. 645–655.
45. *Вилкова, Ю. В.* Изучение способности стромальных клеток костного мозга в культуре к дифференцировке в кардиомиоцитарном направлении / Ю. В. Вилкова // Клеточные культуры. Информационный бюллетень / сост. и науч. ред. М. С. Богданова ; Институт цитологии РАН. СПб, 2008. С. 37–45.
46. *Волотовский, И.* Стволовые клетки : оправдаются ли надежды? / И. Волотовский, А. Руденок // Беларуская думка. 2005. № 2. С. 71–76.
47. *Берсенева, А. В.* Выделение и характеристика нейрональных стволовых клеток из обонятельной области слизистой оболочки носа млекопитающих / А. В. Берсенева // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2005. № 1. С. 13–14.
48. *Изменение* микроструктуры печени после частичной гепатэктомии у крыс / И. М. Газизов [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2013. Т. 8, № 3. С. 101–105.
49. *Получение* культуры тереоцитов из фетальной щитовидной железы кроликов *in vitro* для ксенотрансплантации / В. А. Горанов [и др.] // Медицинский журнал. 2004. № 4. С. 44–46.
50. *Генетика* / М. А. Александрова [и др.]. 2000. Т. 36. № 11. С. 1553–1560.
51. *Генетические* модифицированные мононуклеары пуповинной крови — стимуляторы нейрорегенерации при регенеративных заболеваниях ЦНС / Д. С. Гусева [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2013. Т. 8, № 3. С. 106–112.
52. *Эффективность* использования аутофибробластов при хирургическом лечении пародонтита / А. И. Грудянов [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2013. Т. 8, № 3. С. 72–77.
53. *Дифференцировка* мезенхимальных стволовых клеток в кардиомиоцитарном направлении *in vitro* и *in vivo* / П. В. Кругляков [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2006. № 4.
54. *Егоров, В. В.* Стволовые клетки человека / В. В. Егоров, А. А. Иванов, М. А. Пальцев // Молекулярная медицина. 2003. № 2. С. 3–14.
55. *Зуева, Е. Е.* Стволовые клетки. Некоторые биологические особенности и терапевтические возможности / Е. Е. Зуева, А. В. Куртова, Л. С. Комарова // Гематология. 2005. Т. 6. С. 705–724.
56. *C-kit* и десминпозитивные клетки в регенерации островков поджелудочной железы при экспериментальном диабете у крыс / М. С. Калигин [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2013. Т. 8, № 3. С. 113–115.
57. *Клеточные* технологии в комбустиологии: успехи, проблемы и перспективы / З. Б. Квачева [и др.] // Военная медицина. 2008. № 3. С. 52–59.
58. *Берсенева, А. В.* Клеточная трансплантация — история, современное состояние и перспективы / А. В. Берсенева // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2005. № 1. С. 49–51.

59. Корочкин, Л. И. Стволовые клетки — один из путей регенерации нервной ткани / Л. И. Корочкин // Изв. АН. Сер. Биол. 2001. № 6. С. 666–671.
60. Трансплантация МСК из жировой ткани: получение, стандартизация и использование / С. И. Кривенко [и др.] // Актуальные вопросы гематологии. № 20. С. 52–55.
61. Трансплантация культуры островковых клеток поджелудочной железы в красный костный мозг / С. И. Леонович [и др.] // Медицинский журнал. 2004. № 1. С. 55.
62. Лищук, В. А. Стволовые клетки: исследования и практика / В. А. Лищук, Е. В. Мосткова // Валеология. 2003. № 2. С. 4–16.
63. Возможности направленной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток человека в кардиомиоциты *in vitro* / С. Ю. Мастицкая [и др.] // Медицина. 2009. № 1. С. 56–61.
64. Доставка рекомбинантного аденовируса с клонированным геном GDNF в области травмы спинного мозга при помощи клеток крови пуповины человека, стимулирование восстановления двигательной функции и поддержание популяции глиальных клеток / Я. О. Мухамедшина [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2013. Т. 8, № 3. С. 129–132.
65. Нейротрансплантация для лечения травмы спинного мозга в Китае — результаты международной экспертизы // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2006. № 3.
66. Николаенко, Н. С. Эмбриональные стволовые клетки в культуре и их направленная дифференцировка / Н. С. Николаенко // Информационный бюллетень «Клеточные культуры». СПб, 2001. Вып. 16. С. 24–26.
67. Онтогенез / М. А. Александрова [и др.]. 2003. Т. 34, № 3. С. 167–173.
68. Пальцев, М. А. Молекулярная медицина: достижения и перспективы / М. А. Пальцев // Молекулярная медицина. 2004. № 4. С. 3–8.
69. Беляковский, П. В. Перспективы применения стволовых клеток в офтальмологии / П. В. Беляковский, Е. С. Лобанок // Офтальмология в Беларуси. 2009. № 2 (02). С. 81–91.
70. Стволовые клетки как общебиологическая проблема / Р. А. Полтавцева [и др.] // Онтогенез. 2003. Т. 34, № 3. С. 204–210.
71. Куратова, А. В. Постинфарктная клеточная регенерационная терапия сердечной мышцы / А. В. Куратова, Е. Е. Зуева, А. С. Немков // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2006. № 2 (4). С. 35–43.
72. Кривенко, С. И. Пуповинная кровь как источник гемопоэтических клеток для трансплантации / С. И. Кривенко, А. Л. Усс // Медицинские новости. 2003. № 7. С. 32–37.
73. Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга : свойства, функции, возможность использования в регенеративной и восстановительной терапии / И. В. Пыко [и др.] // Медицинский журнал. 2007. № 4. С. 18–22.
74. Роль EGF-стимулированного эпидермиса в регуляции заживления ран / А. А. Иванов [и др.] // Арх. пат. 2002. № 1. С. 11–14.
75. Децелляризованный матрикс сердца крысы как основа для создания тканеинженерного сердца / А. С. Сотниченко [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2013. Т. 8, № 3. С. 86–94.
76. Стволовые клетки. Перспективы их применения в медицине / З. Б. Квачева [и др.] // Медицинский журнал. 2005. № 4. С. 4–6.
77. Космачева, С. М. Стволовые клетки взрослых : проблемы получения, дифференцировка *in vitro*, перспективы клинического применения / С. М. Космачева, М. В. Волк, М. П. Потапнев // Медицинские новости. 2008. № 9. С. 5–8.

78. *Сухих, Г. Т.* Нейральная стволовая клетка : биология и перспективы нейротрансплантации / Г. Т. Сухих, В. В. Малайцев // Бюлл. эксп. биол. и мед. 2001. Т. 131, № 3. С. 244–255.

79. *Титов, Л. П.* Иммунология : терминологический словарь / Л. П. Титов. М. : МИА, 2008. С. 510.

80. *Филоненко, Е. С.* Перспективы использования плюрипотентных стволовых клеток человека для получения компонентов крови : эритропоэз / Е. С. Филоненко, М. А. Лагарькова, С. Л. Киселев // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2013. Т. 8, № 3. С. 6–10.

81. *Характеристика дендритных клеток человека, полученных с использованием стандартного и «ускоренного» методов культивирования* / Н. В. Гусакова [и др.] // Молекулярная медицина. 2004. № 2. С. 38–44.

82. *Хулуп, Г. Я.* Пластичность стволовых красного костного мозга и их применение в регенеративной медицине / Г. Я. Хулуп, С. Ю. Мастицкая // Медицина. 2006.

№ 1. С. 6–9.

83. *Сравнение эффективности методов получения функционально активных кардиомиоцитов человека* / А. А. Худяков [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2013. Т. 8, № 3. С. 47–55.

84. *Шахов, В. П.* Стволовые клетки и кардиомиогенез в норме и патологии / В. П. Шахов, С. В. Попов. Томск, 2004. 169 с.

85. *Шигина, Ю. В.* Иммунология : учеб. пособие / Ю. В. Шигина. М. : РИОР, 2007. С. 35–39.

86. *Плюрипотентность клеток стромы костного мозга и перспективы их использования в клеточной терапии* / Е. А. Щегельская [и др.] // Онтогенез. 2003. Т. 34, № 3. С. 228–235.

87. *Криоконсервированные мультипотентные МСК стимулируют репаративный хондрогенез в дегенеративно измененном межпозвонковом диске* / М. С. Юхта [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2013. Т. 8, № 3. С. 29–33.

## ТЕРМИНОЛОГИЧЕСКИЙ СЛОВАРЬ

**Аутологичные клетки** — клетки, имеющие происхождение из организма самого пациента, т. е. свои собственные.

**Алогенные клетки** — клетки, происходящие из организма, отличного от организма пациента, т. е. донорские.

**Асимметрическое деление** (син. несимметричное) — такое митотическое деление, при котором дочерние клетки не равнозначны по дифференцировочному потенциалу. Считается, что одна дочерняя клетка сохраняет статус, а вторая — под влиянием факторов микроокружения дифференцируется.

**Банк клеток** — учреждение, производящее гарантированное, по определенным правилам, хранение в низкотемпературных условиях (–196 °С) клеточных образцов, обеспечивающие их последующее применение.

**Внутренняя клеточная масса** (син. эмбриобласт, зародышевый узелок) — у млекопитающих — скопление клеток, расположенных внутри бластоцеля у одного из полюсов. Клетки ВКМ в дальнейшем образуют сам зародыш, а также его провизорные органы — амнион, аллантаоис, желточный мешок. ВКМ — основной источник эмбриональных стволовых клеток.

**Гемопэтическая стволовая клетка** (син. стволовая кроветворная клетка) — мультипотентная стволовая клетка взрослого организма, способная к дифференцировке во все клетки крови.

**Герминогенные стволовые клетки** — тип стволовых клеток-предшественников яйцеклеток и сперматозоидов.

**Дифференцировка** (от лат. differentia — различие) — процесс, в ходе которого клетки стойко реализуют закрепленные детерминацией потенции к развитию до дефинитивного морфофункционального состояния. Дифференцировка клеток происходит как в развивающихся, так и в зрелых тканях и характеризуется экспрессией части генома. Основа дифференцировки — синтез цито- и тканеспецифических белков.

**Клетки «боковой популяции», SP-клетки, Sidepopulation (SP)** — популяция клеток, которые обладают способностью выкачивать некоторые флуоресцентные красители (Hoechst и др.) и изначально представляющие собой гемопэтические клетки.

**Клетка-предшественник** — клетка, находящаяся на низком уровне дифференцировки, но уже коммитированная к развитию в клетки определенной линии.

**Клеточная трансплантация** — трансплантация (трансфузия) различных типов клеток с целью восстановления поврежденных тканей и органов, либо замещения патологически измененных собственных клеток реципиента.

**Коммитированное потомство СК** — СК с направленной дифференцировкой (ранние клетки предшественники).

**Ксеногенные СК** — СК из другого вида организма (от животных к человеку).

**Малигнизация** — процесс превращения недифференцированных стволовых клеток в доброкачественные опухоли или злокачественные новообразования.

**Маркер** — специфический белок, имеющийся у определенных клеток. В качестве маркеров чаще всего используют поверхностные СД-антигены и рецепторы, а также определенные ферменты или цитокины.

**Микроокружение** — 1. Сложная система, включающая клетки и внеклеточный матрикс, обеспечивающая выживание, рост и дифференцировку стволовых клеток посредством специфических биологически активных молекул — сигнальных факторов и межклеточных взаимодействий. 2. Клеточный состав и тип межклеточного вещества, характерный для данной ткани.

**Мультипотентная клетка** — клетка, способная дифференцироваться в нескольких направлениях в пределах тканевых производных одного зародышевого листка.

**Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки** — гетерогенная популяция клеток стромы костного мозга и некоторых иных источников, способная к дифференцировке в клетки, имеющие мезенхимальное происхождение: адипоциты, остеоциты, хондроциты, а также в особых условиях *in vitro* — в клетки эктодермального и энтодермального фенотипа.

**Недифференцированная клетка** — клетка, не обладающая характеристиками клеток той или иной тканевой принадлежности и способная претерпевать процесс дифференцировки.

**Нейральные стволовые клетки** — региональные стволовые клетки, обладающие потенциалом дифференцировки в нейральные и глиальные клетки.

**Опухолевая стволовая клетка** — самоподдерживающаяся стволовая клетка, являющаяся источником развития злокачественной клеточной популяции. Считается доказанным наличие таких клеток при лейкозах и некоторых солидных опухолях.

**Пластичность** — гипотетическая способность стволовых клеток взрослого организма дифференцироваться в клетки нескольких направлений дифференцировки – производных различных зародышевых листков под воздействием различных стимулов.

**Плюрипотентный** (от лат. *pluro* — много, *potentia* — способность) — клетка, способная дифференцироваться по множеству различных

направлений в пределах всех зародышевых листков, а также внезародышевых органов.

**Прогениторные клетки** — стволовые клетки, детерминированные на дифференцировку в определённый тип клеток. Различают мультипотентные и унипотентные прогениторные клетки.

**Пролиферация** (лат. proliferatio, от proles — потомство, ferre — носить, приносить) — процесс клеточного деления, осуществляющегося путем митоза.

**Регенеративная медицина** — область медицины, занимающаяся вопросами восстановления поврежденных или патологически измененных тканей и органов посредством трансплантации стволовых клеток, клеток-предшественников и управления их дифференцировкой.

**Регионарные стволовые клетки** — стволовые клетки, имеющиеся в дефинитивных тканях и обладающие дифференцировочными потенциями в пределах данной ткани.

**Рецепторы** — специальные поверхностные молекулы или их комплексы на мембранах клеток.

**Самообновление (самоподдержание) стволовой клетки** — свойство стволовых клеток, заключающееся в поддержании собственной популяции за счет симметричных или асимметричных делений.

**CD14-молекула** — основной маркер активированных клеток системы мононуклеарных и полинуклеарных фагоцитов.

**CD34-молекула** — маркер ранней дифференцировки клеток костного мозга. Экспрессируется на мембране стволовой клетки и является ее главным маркером.

**CD44-молекула** — поверхностный гликопротеин, выявляемый на мембране мезодермальных (гематопоэтических, фибробластов, глиальных клеток) и некоторых линиях опухолевых клеток.

**CD45-молекула** — трансмембранная тирозиновая фосфатаза. Экспрессируется на мембране гемопоэтических СК.

**CD54-молекула** — мембранный гликопротеин, экспрессируется фибробластами, некоторыми эпителиальными клетками.

**CD59-молекула** — регуляторный белок системы комплемента. Экспрессируется на мембране гемопоэтических и негемопоэтических клеток.

**CD68-молекула** — поверхностный гликопротеин, экспрессируемый на мембране макрофагов, моноцитов, нейтрофилов, базофилов, лимфоцитов. Используется для идентификации нормальных и неопластических клеток.

**CD123-молекула** — рецепторный мембранный белок экспрессируется на СК костного мозга.

**СД124-молекула** — рецепторный мембранный белок экспрессируется на ГСК.

**Стволовая клетка** — любая недифференцированная или малодифференцированная клетка, которая способна поддерживать собственную популяцию и продуцировать по крайней мере 1 тип коммитированных клеток-предшественников.

**Стволовые клетки пуповинной крови** — стволовые клетки, выделенные из сосудов пупочного канатика после рождения ребенка.

**Стволовые клетки взрослых, стволовые клетки дефинитивных тканей** — стволовые клетки, находящиеся в тканях взрослого организма.

**Стволовые клетки костного мозга** — собирательное понятие, под которым понимают как минимум две различные популяции стволовых клеток, находящиеся в костном мозге: стволовые кроветворные клетки (гемопоэтические стволовые клетки) и мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки — общие предшественники мезенхимальных производных.

**Стромальные клетки** — совокупность клеток преимущественно соединительнотканной природы (ММСК, ретикулярных клеток, адипоцитов, фибробластов и др.) формирующих каркас (основу) кроветворных органов. Исключение — тимус, в котором стромальные клетки имеют эпителиальное происхождение. Также этим термином могут обозначаться собственно соединительнотканые клетки всех остальных паренхиматозных и трубчатых органов. Главным образом формирующие их механический каркас.

**Терапевтическое клонирование** — процедура переноса ядра соматической клетки с целью получения индивидуальной линии ЭСК в терапевтических целях.

**Тканевая инженерия** — междисциплинарная область знаний, включающая в себя биологию, медицину и технические науки, изучающая создание *in vitro* эквивалентов тканей и органов, использующая принцип трансплантации клеточной культуры на биосовместимом носителе.

**Тотипотентный** (от лат. *totalis* — общий, целый, *potentia* — способность) — клетка, способная дифференцироваться не только во все клеточные линии, характерные для данного вида, но и, размножаясь, формировать целостный организм.

**Трансдифференцировка** (от лат. *trans* — через, *differentia* — различие; син. пластичность) — способность стволовой клетки взрослого дифференцироваться в клетки другого зародышевого листка.

**Трансплантант** (от лат. *transplanto* — пересаживать) — совокупность клеток, фрагмент ткани или орган, используемый для пересадки.

**Унипотентный** (от лат. unus — один, potentia — способность) — способный дифференцироваться только в одном направлении (в клетки одной линии). Например: стволовые сперматогенные клетки.

**Хоуминг** — способность клеток мигрировать или «возвращаться» в ткани, из которых они были получены, и интеграция клеток в эти ткани посредством специфических рецепторов хоуминга.

**Фетальные стволовые клетки** (от лат. fetus — плод) — стволовые клетки плода, источником которых служит абортивный материал на 9–12 неделях беременности.

**Фидер** — слой поддерживающих клеток, необходимых для выживания и функционирования в культуре некоторых типов клеток.

**Цитомегаловирусы** — вирусы представители семейства герпес-вирусов.

**Цитокины** — эндогенные регуляторные пептиды, продуцируемые практически всеми ядродержащими клетками организма, причем гены некоторых цитокинов экспрессируются во всех без исключения клетках организма.



## ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений.....	3
Понятие о стволовых клетках.....	4
История открытия, изучения и применения стволовых клеток.....	6
Характеристика типов стволовых клеток .....	7
Стволовые клетки взрослого организма .....	10
Основные биологические свойства стволовых клеток.....	19
Основные понятия о цитокинах и ростовых факторах — регуляторах межклеточного взаимодействия.....	26
Клеточные технологии.....	27
Методы выделения и культивирования стволовых клеток.....	28
Терапевтическое клонирование.....	33
Генная инженерия .....	34
Регенеративная медицина .....	34
Банк стволовых клеток.....	35
Трансплантация СК в лечебных целях.....	37
Проблемы, возникающие при выделении, культивировании и трансплантации стволовых клеток.....	45
Литература.....	51
Терминологический словарь.....	56

Учебное издание

**Мезен** Нина Иосифовна  
**Квачева** Зинаида Болеславовна  
**Сычик** Людмила Михайловна

# **СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ**

Учебно-методическое пособие

*2-е издание, дополненное*

Ответственный за выпуск В. Э. Бутвиловский  
Компьютерная верстка Н. М. Федорцовой

Подписано в печать 31.10.13. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Снегурочка».  
Ризография. Гарнитура «Times».  
Усл. печ. л. 3,72. Уч.-изд. л. 3,4. Тираж 99 экз. Заказ 193.

Издатель и полиграфическое исполнение: учреждение образования  
«Белорусский государственный медицинский университет».  
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,  
распространителя печатных изданий № 1/187 от 18.02.2014.  
Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.