

150 ЛЕТ КОНЦЕПЦИИ «СТВОЛОВАЯ КЛЕТКА»

© Ю. В. Суханов,¹ Е. А. Воротеяк,^{1, 2, 3} А. В. Васильев,^{1, 2}
В. В. Терских¹

¹ Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН,
Москва, Россия

E-mail: vorotelyak@yandex.ru

² Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Москва, Россия

³ Российский национальный исследовательский медицинский
университет им. Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Обзор рассматривает истоки появления концепции стволовой клетки и ее развитие в XX в. и позднее. Прослежено изменение содержания термина «стволовая клетка» в ходе развития биологической науки в XIX в. и возникновения клеточной биологии во второй половине XX в.

Ключевые слова: стволовая клетка, гемопоэз, колониеобразующие единицы, зародышевая плазма, мультипотентные стволовые клетки.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 1. С. 18—30. 2018

Yu. V. Sukhanov,¹ E. A. Vorotelyak,^{1, 2, 3} A. V. Vasiliev,^{1, 2} V. V. Terskikh.¹ 150 YEARS OF CONCEPT OF STEM CELL. ¹ N. K. Koltsov Institute of Developmental Biology, Moscow, Russia; ² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia; ³ N. I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia; e-mail: vorotelyak@yandex.ru.

The review considers the origin of stem cell concept and its development in XX century and later. The authors trace how the meaning of the term “stem cell” has been changing throughout biology development in XIX century and rapid advances in cell biology at the end of XX century and further.

Key words: stem cell, hemopoiesis, colony forming units, embryonic plasma, multipotent stem cells.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 1. P. 18—30. 2018

Концепция «стволовая клетка», как и все великие научные концепции, претерпела длительное развитие. Она возникла в эпоху расцвета эмбриологии и гистологии во второй половине XIX в. Сначала этот термин был отнесен к гипотетической клетке, а затем в течение нескольких десятилетий шли поиски реальной клетки, которая могла бы соответствовать предложенной концепции. И только значительно позднее, спустя почти 80 лет, появились первые экспериментальные подходы к изучению стволовых клеток. Содержание термина «стволовая клет-

ка», так же как терминов «клетка», «митоз» или «ген», со временем менялось. Концепция стволовой клетки приобретала все большее значение для биологии клетки. Изучение стволовых клеток оказалось важным для понимания механизмов эмбрионального развития, дифференциации клеток и поддержания функции органов. Способность стволовых клеток самоподдерживаться и производить дифференцированных потомков позволяет использовать их для создания новых направлений клеточной терапии и регенеративной медицины. Изучение стволовых клеток объединяет специалистов из разных областей науки, включающих биологию развития, клеточную биологию, генетику и эпигенетику, физиологию, системную биологию, онкологию, регенеративную медицину и другие отделы медицины.

В эпоху бурного изучения биологии стволовых клеток представляет интерес вспомнить истоки концепции «стволовая клетка».

ПРОИСХОЖДЕНИЕ ТЕРМИНА «СТВОЛОВАЯ КЛЕТКА»

Гипотеза существования стволовой клетки первоначально возникла в эпоху расцвета германской науки во время победоносного шествия клеточной теории, которую впервые сформулировали М. Шлейден в 1838 г. и Т. Шванн в 1839 г. Позднее Рудольф Вирхов дополнил важнейшие положения клеточной теории знаменитым тезисом «*omnis cellula e cellulae*» [65]. Термин «стволовая клетка» в 1868 г. предложил выдающийся немецкий биолог Э. Геккель (E. Haeckel), профессор зоологии и последователь теории Дарвина, полагавший, что многоклеточные организмы в процессе эволюции произошли от гипотетического одноклеточного предка (*protozoa*), которого он назвал стволовой клеткой (*Stammzelle*) [18]. На выбор термина, очевидно, повлияло отображение биологами родственных отношений всего органического мира в виде родословного или филогенетического древа (*Stammbaum*). Позднее, в переработанном третьем издании своей книги *Anthropogenie*, Геккель использовал термин «стволовая клетка» в эмбриологическом контексте для обозначения оплодотворенной яйцеклетки, из которой в процессе развития происходят все клетки взрослого организма [19]. Такое употребление термина «стволовая клетка» было связано с его знаменитым биогенетическим законом, согласно которому онтогенез представляет собой ускоренную рекапитуляцию филогенеза.

На дальнейшее использование термина «стволовая клетка» повлияла теория зародышевой плазмы (*Keimplasma*), которую предложил Август Вейсман (*August Weismann*), постулировавший непрерывность передачи зародышевой плазмы в последовательных поколениях клеток. Он считал, что в многоклеточных организмах зародышевая плазма в процессе эмбриогенеза переходит в специализированные зародышевые клетки, которые в отличие от соматических клеток обеспечивают передачу наследственных признаков посредством яйца и спермия от одного поколения к другому [66]. Под влиянием идей А. Вейсмана, Т. Бовери (*T. Boveri*) и В. Геккер (*V. Häcker*) изучали линии клеток, в которых не происходит диминуция хроматина в процессе эмбрионального развития. В. Геккер, изучавший развитие ракообразного *Cyclops*, обнаружил большую клетку, которую он называл стволовой. Эта клетка интернализировалась при гастрულიции и претерпевала асимметричное деление. При этом одна дочерняя клетка давала начало зародышевым клеткам, а другая была предшественницей мезодермы. В. Геккер считал стволовыми клетки, которые в дальнейшем развитии организма производят в гонадах ооциты [20]. В это же время Т. Бовери изучал эмбриогенез нематоды *Ascaris megalocephala*, у которой происходит диминуция хроматина в соматических клетках и только в клетках зародышевой линии сохраняется полный комплект хроматина, первоначально присутствующий в оплодотворенном яйце. Бовери использовал термин Геккеля «стволовая клетка», но сделал еще один

шаг: он назвал стволовыми клетки, которые происходят из оплодотворенного яйца и приводят к образованию линии зародышевых клеток [4]. Таким образом, в этих ранних исследованиях термин стволовая клетка был использован для обозначения того, что в настоящее время называют стволовыми клетками линии зародышевых клеток и примордиальными зародышевыми клетками. Следует отметить, что стволовые клетки не были основным объектом исследований ни В. Геккера, ни Т. Бовери. Они лишь воспользовались термином Геккеля «стволовая клетка» для описания клеток, обнаруженных в процессе эмбриогенеза. В англоязычной литературе термин «стволовая клетка» (stem cell) широко использовал Э. Вилсон (E. Wilson). В своей знаменитой книге «The cell in development and inheritance» [67] он описал результаты исследований Геккера и Бовери. Благодаря огромному влиянию этой книги на эмбриологов и генетиков в США Вилсону часто приписывают выбор термина «стволовая клетка», хотя он использовал его в том же смысле, в каком его использовали в более ранних исследованиях Т. Бовери и В. Геккер.

Дальнейшее использование термина «стволовая клетка» связано с изучением гемопоэза. На рубеже XX в. физиологи и гистологи, изучавшие развитие гемопоэтической системы, широко обсуждали вопрос о существовании предшественников клеток крови. Введение в 1879 г. в практику гистологической окраски Эрлиха [14] позволило идентифицировать клетки разных линий «белой крови». Благодаря этому сложились две основных точки зрения: одна группа исследователей (дуалисты) считала, что миелоидные и лимфоидные клетки происходят от предшественников, находящихся в разных тканях: в костном мозге и лимфатических узлах/селезенке. Другие исследователи выдвигали унитарную (или монофилетическую) модель гемопоэза, согласно которой существует прогениторная клетка, обеспечивающая общее происхождение эритроцитов, гранулоцитов и лимфоцитов. По характеру гистологической окраски, предложенной Эрлихом, лимфоциты считали незрелыми клетками с прогениторной активностью. В 1896 г. А. Паппенгейм [50] предположил, что и красные, и белые клетки крови происходят от общего предшественника — стволовой клетки. Ряд исследователей полагали, что лимфоциты могут быть общим предшественником всей гемопоэтической системы. Эти клетки называли поливалентными большими лимфоцитами, истинными большими лимфоцитами, гемобластами, гемоцитобластами. В поисках подходящего термина для обозначения общего гипотетического предшественника гемопоэтической системы многие исследователи, в том числе А. Паппенгейм, А. А. Максимов [33], В. М. Данчакова [10], Е. Ньюман [43] и другие, использовали термин «стволовая клетка крови» (Blutstammzelle) [12].

Выдающийся русский гистолог Александр Александрович Максимов (1874—1928) внес огромный вклад в изучение гематологии, в частности в создание монофилетической теории кроветворения и, по мнению многих исследователей, является основоположником термина Blutstammzelle. Максимов в течение многих лет работал в Санкт-Петербурге в качестве профессора гистологии и эмбриологии Военно-медицинской академии. В 1909 г. А. А. Максимов представил выдающиеся результаты своих исследований на сессии Гематологического общества Берлина. Его лекция называлась «Лимфоцит как общая стволовая клетка разных элементов крови в эмбриональном развитии и в постфетальной жизни млекопитающих» [34]. Он заключил свою лекцию следующими словами: «В организме млекопитающего существует один тип клеток, лимфоцит в самом широком смысле слова, который может выгладеть по-разному в зависимости от места пребывания, а также от локальных условий и который может производить разные продукты клеточной дифференциации. Лимфоциты являются вездесущими (ubiquitär) и равноценными повсюду, гистологически и гематологически не различимыми».

Другим выдающимся исследователем стволовых клеток была Вера Михайловна Данчакова, родившаяся в Санкт-Петербурге в 1879 г. Она изучала медицину и в 1906 г. представила докторскую диссертацию. В 1908 г. она была первой

женщиной в России, получившей должность приват-доцента Императорского московского университета. Она использовала термин «стволовая клетка» в работе 1908 г., касавшейся развития крови и соединительной ткани птиц [10]. Стволовыми клетками крови она считала негранулированные недифференцированные лимфоциты. С 1915 г. В. М. Данчакова работала в Рокфеллеровском институте медицинских исследований, а позднее в Колумбийском университете, в Колледже врачей и хирургов, под руководством Томаса Моргана (будущего лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине). Ее работы в области биологии крови и стволовых клеток крови оказали значительное влияние на широкие научные круги того времени. В Америке ее называли «матерью стволовых клеток» («the mother of stem cells»). В лекции 1916 г., посвященной развитию гемопозитической системы с точки зрения монофилетической школы, она говорила: «...эритроциты, малые лимфоциты, различные лейкоциты, блуждающие клетки соединительной ткани, тучные клетки и плазматические клетки — все эти клетки являются разными клеточными единицами, как морфологически, так и физиологически, но на ранних эмбриональных стадиях все они имеют общую материнскую клетку, и эта материнская клетка сохраняется во взрослом организме и становится источником дифференциации и регенерации и, весьма вероятно, источником патологической пролиферации» [11].

Были выдвинуты и другие гипотезы, касающиеся стволовой клетки крови, однако все они были умозрительными, поскольку в то время не существовало адекватных методов экспериментального изучения стволовых клеток, а цитологические методы в редких случаях позволяют изучать стволовые клетки. Кроме того, как было показано в дальнейшем, доля стволовых клеток крови составляет приблизительно 1 : 10 000 клеток костного мозга, что крайне затрудняет их цитологическое изучение. Многие годы работы Максимова, касающиеся стволовых клеток крови, оставались забытыми. Интерес физиологов к изучению стволовых клеток крови возобновился в 1960-х гг.

КОЛОНИЕОБРАЗУЮЩИЕ ЕДИНИЦЫ

В течение многих лет изучение стволовых клеток крови тормозилось из-за невозможности непосредственно их идентифицировать и количественно оценивать. В 1950-е гг. сформировалась всеобъемлющая концепция, касающаяся пролиферации клеток крови, структуры клеточной популяции и кроветворной системы в целом, что позволило по-новому взглянуть на биологию стволовых клеток [8]. Изучение кроветворения позволило сделать несколько важных заключений относительно структуры клеточной популяции. Вся популяция кроветворных клеток была подразделена на три основных компартмента. В первом компартменте находятся стволовые клетки, которые производят новые стволовые клетки и комитированные клетки, которые поступают во второй компартмент, где находятся клетки на ранней стадии дифференциации, обладающие ограниченным пролиферативным потенциалом. Из этого компартмента клетки поступают в третий компартмент, состоящий из специализированных клеток, таких как эритроциты или полиморфноядерные лейкоциты, выполняющие специфические функции. Самым большим потенциалом обладают стволовые клетки, они способны к самоподдержанию на протяжении жизни организма. Следует подчеркнуть, что представление о стволовых клетках оставалось теоретическим, не соотношенным с конкретной физической сущностью.

В это время работы в области стволовых клеток оказались «побочным продуктом» изучения радиочувствительности клеток костного мозга. В 1940-х гг. активно развивалась техника трансплантации крови и костного мозга, что отразилось на последующих работах в области стволовых клеток. В конце 1940-х и в 1950-е гг. в связи с появлением атомной промышленности и производством изо-

топов происходило активное изучение радиочувствительности биологических объектов. В 1949 г. было показано, что мыши, облученные в летальной дозе, выживают, если селезенку защитить свинцовой фольгой [24]. Вслед за этим было найдено, что облученных мышей и морских свинок защищает внутривенное введение клеток костного мозга [32]. Первоначальное предположение заключалось в том, что токсический фактор облучения имеет не клеточную природу, но использование клеток костного мозга для защиты от облучения поставило вопрос и о возможной клеточной природе радиационного эффекта. Позднее было установлено, что радиационный эффект связан с глубоким поражением органов и тканей, а гистологический анализ показал, что одной из наиболее чувствительных тканей оказался костный мозг. Вскоре было установлено, что смерть облученных животных происходит в результате миелоабляции [1, 18]. Большое значение для изучения кроветворных стволовых клеток имело развитие в 1940—50-х гг. методов переливания крови и трансплантации клеток костного мозга.

Е. А. McCulloch, Е. Till [36] изучали защитную функцию клеток костного мозга, трансплантированных летально облученным мышам. Их интересовали количественные аспекты радиочувствительности клеток костного мозга. Они сопоставляли защитные свойства костного мозга с числом живых трансплантированных клеток. В 1961 г. эти авторы опубликовали работу, в которой показали, что на поверхности селезенки облученных мышей через 9—14 дней после трансплантации клеток костного мозга, образуются макроскопические узелки («nodules») — колонии, представляющие собой кластеры гемопоэтических клеток, среди которых встречаются пролиферирующие клетки. Признаки дифференциации клеток были сильнее выражены в колониях на 11-й день после трансплантации костного мозга. В этих колониях можно было наблюдать клетки, которые дифференцировались по трем направлениям: эритроцитарному, гранулоцитарному и мегакариоцитарному [20]. Е. А. McCulloch и Е. Till обнаружили линейную зависимость между числом трансплантированных клеток костного мозга и числом образованных колоний. Это позволило им заключить, что колонии образуют одиночные живые клетки костного мозга. Поскольку в костном мозге присутствуют разные типы клеток, авторы не идентифицировали клетки, образующие колонии, а назвали их колониеобразующими единицами (colony-forming units, CFU). Позднее, клетки костного мозга, которые формируют колонии в селезенке, стали идентифицировать со стволовыми клетками на том основании, что они, с одной стороны, способны к длительной пролиферации и самоподдержанию (self-renewal), с другой стороны, они производят дифференцированные клетки [55, 61]. Анализируя цитокинетику и регуляцию прогениторных клеток крови, L. G. Lajtha [28] предложил «концепцию колониеобразующих клеток заменить на концепцию колониеобразующего свойства стволовых клеток».

Дальнейшие эксперименты показали, что некоторые колонии содержали клетки, способные при трансплантации вторичным облученным реципиентам формировать у них в селезенке сходные макроскопические мультипотентные колонии. Эти эксперименты позволили заключить, что большая продолжительность жизни, способность самоподдерживаться и давать начало дифференцированным клеткам являются характерными признаками колониеобразующих клеток. Кроме того, авторы обратили внимание на исключительную гетерогенность в распределении отдельных типов клеток между колониями. Некоторые колонии содержали большое число колониеобразующих клеток, тогда как в большинстве колоний их было очень мало [16, 55].

С помощью цитологических методов А. J. Becker и соавт. [3] изучили хромосомные aberrации в колониях, образованных облученными клетками. Они подтвердили предположение, что каждая колония является клоном, образованным одной стволовой клеткой крови. Эти клетки обладают большой продолжительностью жизни и большим пролиферативным потенциалом, поскольку в течение короткого времени образуют макроскопические колонии, содержащие многие

миллионы клеток. Первоначальная интерпретация полученных результатов основывалась на упрощенном предположении, что для выживания реципиентов необходимо трансплантировать определенное число репопулирующих клеток костного мозга.

Исторически основным методический подход для экспериментального выявления и изучения свойств стволовых клеток заключался в трансплантации различных клеток костного мозга облученным животным. При этом стволовые клетки определяли ретроспективно по репопуляции костного мозга или образованию колоний в селезенке. Этот подход предполагал, что облучение «освобождает место» для трансплантируемых клеток, однако со временем он был подвергнут критике. Было показано, что долговременная трансплантация клеток костного мозга происходит и без предварительного облучения реципиента [59] в результате конкуренции стволовых клеток за нишу. Кроме того, оказалось, что не все классы стволовых клеток обладают одинаковой репопуляционной активностью [45], а некоторые фракции стволовых клеток вообще не проникают в костный мозг при внутривенном введении [35]. Было высказано предположение, что облучение может существенно влиять на микроокружение и, вследствие этого, на репопуляционную активность пересаженных стволовых клеток. R. G. Worton и коллеги [68] с помощью седиментации в градиенте фетальной сыворотки разделили клетки костного мозга мыши на ряд фракций и посмотрели образование колоний в селезенке клетками отдельных фракций, а также изучили способность этих клеток к самоподдержанию путем повторной трансплантации. Оказалось, что клетки медленно оседающих фракций имели повышенную способность образовывать колонии по сравнению с быстро оседающими фракциями. Авторы также заключили, что гетерогенность клеток в отдельных колониях может зависеть от эндогенных различий между стволовыми клетками. Дальнейшие исследования показали, что популяция стволовых клеток весьма гетерогенна. В ней можно различить по крайней мере два класса мультипотентных стволовых клеток: долгоживущих и короткоживущих. Долгоживущие стволовые клетки самоподдерживаются на протяжении жизни организма, тогда как короткоживущие способны самоподдерживаться приблизительно 8 недель [42]. Линия долгоживущих стволовых клеток (LT-HSCs) дает короткоживущие стволовые клетки (ST-HSCs), которые в свою очередь дают мультипотентные прогениторы (MPPs) [41]. В организме стволовые клетки присутствуют во многих гемопоэтических органах и включают большое число разных типов трансплантируемых гемопоэтических клеток с разными регенеративными свойствами [39].

Тем не менее работа E. A. McCulloch и E. Till была первой экспериментальной попыткой определить численность гемопоэтических клеток, обладающих радиопротекторными свойствами. Фактически авторы обнаружили взрослые мультипотентные клетки, образующие клоны с гемопоэтической активностью. Такой подход дал возможность количественно охарактеризовать популяцию клеток, которую в то время было невозможно идентифицировать ни одним из существовавших способов. Почти два десятка лет после этого открытия колониеобразующие клетки служили моделью для изучения стволовых клеток. Оценка количества стволовых клеток по числу колониеобразующих единиц давала только приблизительные результаты. Более прямая оценка стала возможна только в 1980-х гг., когда появилась возможность идентифицировать стволовые клетки с помощью моноклональных антител против антигенов поверхности гемопоэтических клеток. Впервые поверхностный маркер стволовых клеток крови был обнаружен с помощью моноклональных антител My-10, полученных путем иммунизации мышей клетками линии KG-1a миелобластоидной лейкемии человека [7]. Позднее этот маркер был обозначен как CD34⁺ кластер дифференциации [23]. В последующие десятилетия это направление сыграло ведущую роль в изучении биологии и физиологии стволовых клеток, регуляции пролиферации и дифференциации прогениторных/стволовых клеток крови.

Внутривенное введение мультипотентных стволовых клеток крови позволяло восстанавливать длительное кроветворение и защищать реципиентов от облучения в летальных дозах. Многие колонии, образовавшиеся в селезенке, состояли из смеси зрелых клеток эритроидной, мегакариопоэтической и гранулоцитарно-макрофагальной линий. Позднее было показано, что клетки, образующие колонии, способны производить также предшественников лимфоцитов [69]. Таким образом, было сделано заключение, что у взрослых мышей сохраняются стволовые клетки крови со всеми потенциями к дифференциации. Почти через 20 лет, на новом методическом уровне, с помощью трансфекции кроветворных клеток ретровирусными векторами было показано, что примитивные гемопоэтические стволовые клетки восстанавливают кроветворную систему и образуют клоны, характеризующиеся мультипотентностью, т. е. производят миелоидные и лимфоидные линии клеток [12, 26].

ФОРМИРОВАНИЕ КОНЦЕПЦИИ

Первые попытки оценить способность стволовых клеток крови к самоподдержанию основывались на методе трансплантации колониеобразующих клеток облученным мышам. L. Siminovitch и коллеги [56] показали, что при серийных трансплантациях способность стволовых клеток к самоподдержанию быстро снижалась и, в конце концов, практически не определялась. Таким образом, было сделано заключение, что самоподдержание стволовых клеток происходит длительное, но ограниченное время. В это же время L. Nauflick [21, 22], изучая пролиферацию фетальных клеток человека, показал, что в культуре продолжительность жизни клеток ограничена 40—60 делениями, после чего пролиферация останавливается и клетки начинают стареть. Чтобы согласовать наблюдаемую ограниченную продолжительность жизни клеток с длительным поддержанием кроветворения в организме, была предложена такая модель функционирования кроветворной системы, когда редко делящиеся стволовые клетки производят клоны активно пролиферирующих клеток, при этом клоны последовательно сменяются (clonal succession model) [25]. Дальнейшие исследования в этом направлении продолжают в течение нескольких десятилетий. Чтобы объяснить, как стволовые клетки могут самоподдерживаться и при этом давать начало дифференцированным клеткам, E. E. Osgood [48] предположил, что стволовые клетки способны делиться двумя способами: симметрично и асимметрично. Он обратил внимание на то, что клеточная система, в которой стволовые клетки не способны к симметричному делению, не смогла бы восстановиться после частичной гибели стволовых клеток, например при радиационном повреждении костного мозга. Поэтому симметричное деление типа « α -2 α » происходит, когда необходима быстрая регенерация поврежденной ткани с увеличением числа стволовых клеток. Асимметричное деление типа « α - α » преобладает в стационарном состоянии, когда продукция дифференцированных клеток и поддержание размера клеточной популяции происходит за счет асимметричного деления.

Происхождение стволовых клеток крови в эмбриогенезе интересовало исследователей еще в XIX в. На основании первых опытов было предположено, что в эмбриогенезе мыши гемопоэтические стволовые клетки формируются *de novo* только в желточном мешке. В процессе дальнейшего развития гемопоэтические клетки циркулируют в кровяном русле и колонизируют гемопоэтические органы [40]. В последующих исследованиях был установлен исключительно важный источник гемопоэтических стволовых клеток — аорто-гонадомезонефральная область [17].

Керри и Трентин изучали поведение клеток в колониях, образованных изогенными клетками. Они показали, что колонии бывают разного размера и образованы разными типами кроветворных клеток. В колониях обнаруживаются

эритроидные, нейтрофильные, мегакариоцитные и эозинофильные клетки крови. Наиболее часто встречаются эритроидные колонии, затем нейтрофильные и мегакариоцитные. Эозинофильные колонии были редки, а колонии, образованные недифференцированными клетками, встречались крайне редко. Вначале все колонии дифференцируются в одном направлении. Встречаемость смешанных колоний увеличивается со временем. На основании своих работ и данных других авторов они предположили, что типичные колонии образованы одной клеткой. На дифференциацию стволовой клетки влияет микроокружение, а также системные гуморальные факторы [9].

Длительное время стволовые клетки крови рассматривали в отрыве от окружающей среды, хотя еще А. А. Максимов и другие авторы [9, 63] указывали на возможную роль микроокружения в функционировании стволовых клеток. В 1978 г. R. Schofield [54] предложил свою гипотезу относительно роли микроокружения в формировании стволовыми клетками крови колоний в селезенке. Эти предположения достаточно долго носили умозрительный характер и не находили подтверждения. Впервые увидеть анатомическую структуру ниши удалось на примере крошечного круглого червя *Caenorhabditis elegans*, ставшего классическим лабораторным организмом. Благодаря простому анатомическому строению его гонад были обнаружены две соматические клетки, которые контролировали пролиферацию зародышевых клеток в гонаде [27]. Гипотеза ниши в дальнейшем превратилась в исключительно важный и стремительно развивающийся раздел биологии стволовой клетки.

L. G. Lajtha и соавт. [29] еще в начале 1950-х гг. изучал пролиферацию клеток костного мозга, структуру клеточного цикла и влияние радиации на пролиферативные процессы. Эти исследования носили теоретический характер до тех пор, пока не появилась работа Тилла и МакКаллока. Анализируя данные по кинетике клеточных популяций, L. G. Lajtha предположил, что в стационарных клеточных популяциях значительная часть клеток выходит из клеточного цикла и длительное время находится в состоянии пролиферативного покоя (фаза G_0). Эти клетки редко циклируют, что способствует сохранению в них генетической информации. Лайта полагал, что в нормальном костном мозге стволовые клетки, обладающие максимальным пролиферативным потенциалом, находятся в фазе G_0 . При массовой гибели клеток крови или при потерях крови стволовые клетки получают стимул для активной пролиферации, в результате чего происходит восстановление клеточного гомеостаза [30, 31].

В кроветворных органах (костный мозг, селезенка), находящихся в стационарном состоянии, отмечен минимальный синтез ДНК (по включению меченого тимидина) и, следовательно, минимальная пролиферация стволовых клеток, тогда как в активно растущих кроветворных системах (фетальная печень, регенерирующие трансплантаты) около 40—65 % стволовых клеток находятся в фазе синтеза ДНК [2]. При этом в состоянии покоя стволовые клетки крови оказываются устойчивыми ко многим внешним неблагоприятным факторам и хемотерапевтическим агентам [6].

Изучение действия цитостатического агента 5-фторурацила, начавшееся еще в 1960-е гг. [53], со временем позволило выяснить, что он вызывает гибель пролиферирующих кроветворных клеток, тогда как стволовые клетки в состоянии покоя сохраняют жизнеспособность. Эти стволовые клетки оказались более примитивными (с большим пролиферативным потенциалом), чем колониеобразующие клетки, им требовалось больше времени, чтобы сформировать колонии в селезенке летально облученных мышей, причем эти колонии были крупнее [64].

В 1950-е годы были достигнуты значительные успехи в культивировании фибробластов и эпителиальных клеток *in vitro*. Развитие техники культивирования животных клеток позволило создать новые методы выращивания клеток крови *in vitro*. Большой успех был достигнут, когда D. H. Pluznik и L. Sachs [51] и T. R. Bradley и D. Metcalf [5] описали методы выращивания колоний клеток раз-

ных кроветворных органов в культуре. С этой целью клетки культивировали в питательном агаре на поверхности слоя фидерных клеток. Колонии были сформированы гранулоцитами и макрофагами — важными компонентами иммунной системы организма [5]. Этот метод позволил анализировать рост единичных клеток и открыть цитокины, необходимые для сохранения жизнеспособности и пролиферации стволовых и прогениторных клеток крови, которые получили название колониестимулирующие факторы (colony-stimulating factors, CSFs) [37, 58].

В 1988 г. были опубликованы первые перспективные опыты по обогащению и очистке гемопоэтических стволовых клеток из костного мозга мыши с помощью флуоресцентного активированного сортирования (FACS) и моноклональных антител. В группе И. Л. Вейсмана (I. L. Weissman) была выделена популяция обогащенных гемопоэтических клеток мыши с фенотипом $\text{Thy-1}^{\text{low}} \text{Lin}^- \text{Sca-1}^+$, составлявших приблизительно 0.05 % взрослых клеток костного мозга мыши. Эти клетки обеспечивали длительное восстановление полноценной гемопоэтической системы при трансплантации летально облученным мышам [57].

Изучение лейкоэмических клеток хронической миелоцитарной лейкемии (ХМЛ) показало, что эта болезнь имеет клональное происхождение. Это было доказано путем цитогенетического анализа клеток крови на присутствие филадельфийской хромосомы, которая обнаруживалась во всех трех миелоидных линиях [47]. П. Фиалков и коллеги подтвердили клональную природу ХМЛ у женщин, гетерозиготных по локусу глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в X-хромосоме: этот изоэнзим служил маркером. Электрофоретический анализ образовавшихся неоплазм показал, что все клетки содержали только одну из двух форм энзима [15]. Эти работы подтвердили существование стволовых клеток крови и показали, что ХМЛ является клональной болезнью, возникающей в результате трансформации стволовых (или примитивных прогениторных) клеток крови. Дальнейшие работы подтвердили существование стволовых клеток в гемобластозах (лейкозах и лимфомах) и солидных опухолях.

Огромные успехи в изучении кроветворной системы были отражены в замечательной монографии [38], которая подвела итог активному исследованию кроветворных стволовых клеток в 1960-е годы и открыла новые пути для их дальнейшего изучения. В этой монографии был дан обзор сложившихся представлений в области регуляторных процессов, дифференциации, пролиферации и созревания клеток крови. Была описана постоянная миграция клеток крови между разными кроветворными органами как взрослыми, так и эмбриональными. Поскольку в то время морфологическое описание стволовых кроветворных клеток оставалось проблематичным, основное внимание было уделено функциональному изучению стволовых клеток путем получения мультипотентных колоний в селезенке и колоний кроветворных клеток в культуре *in vitro*. Были сформулированы два основных свойства стволовых клеток: 1) способность самоподдерживаться и длительно пролиферировать и 2) дифференцироваться в разных направлениях и производить кроветворные клетки разных линий. Прогениторными считались клетки, способные развиваться в направлении одной определенной линии клеток под действием специфических гуморальных факторов. Большое внимание было уделено роли микроокружения в функционировании стволовых клеток крови.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В шестидесятых годах XX в. был заложен фундамент для экспериментального изучения биологии стволовых клеток. Исторически сложилось так, что классические представления о биологии стволовых клеток были получены при изучении кроветворения. Не будучи идеальной, гемопоэтическая система оказалась наиболее удобной для изучения функциональных характеристик стволовых клеток взрослых млекопитающих. Этому способствовали два главных фактора:

1) компоненты гемопоэтической системы можно было идентифицировать и обогащать на основе маркеров клеточной поверхности и 2) эта система позволяла разработать различные методы функционального анализа для детального изучения стволовых и прогениторных клеток. Благодаря свойствам кроветворной системы произошел огромный прорыв в изучении стволовых клеток, когда возникла проточная цитофотометрия с использованием моноклональных антител к маркерам клеточной поверхности, когда началось использование методов молекулярной биологии.

Эти исследования выявили очень сложную иерархическую организацию гемопоэза у взрослых организмов и в процессе эмбрионального развития. Было изучено большое число молекулярных механизмов, влияющих на жизнеспособность, пролиферацию, самоподдержание и дифференциацию гемопоэтических стволовых клеток. Исследована роль ниши в функционировании стволовых клеток.

На основании ранних исследований процесса кроветворения E. Till и E. A. McCulloch [62] предложили иерархическую модель гемопоэза. Согласно этой модели, на вершине пирамиды находится минорная популяция гемопоэтических стволовых клеток, продуцирующих клоны, которые в результате последовательных этапов дифференциации образуют зрелые форменные элементы крови.

Детальное изучение стволовых кроветворных клеток создало стимул для изучения стволовых клеток многих тканей, в том числе эпидермиса кожи, эпителия кишечника, сперматогонияльных стволовых клеток. До настоящего времени кроветворные стволовые клетки остаются наиболее изученными и считаются «золотым стандартом», с которым сравнивают стволовые клетки других тканей. Основные теоретические положения, касающиеся стволовых клеток, были сформулированы уже в 1960-е гг. В дальнейшем они развивались в результате использования новых технологий и новых методических подходов. На пороге XXI в. изучение стволовых клеток стало одним из ведущих направлений современной клеточной биологии [13, 44], а концепция стволовой клетки остается исключительно привлекательной для многих исследователей в разных областях биологии и медицины и продолжает развиваться.

Работа поддержана программой развития биоресурсных коллекций ФАНО, тема Госзадания № 0108—2017-0009.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[1] Barnes D. W. H., Ford C. E., Gray S. M., Loutit J. F. Spontaneous and induced changes in cell populations in heavily irradiated mice. *Progress in nuclear energy. Biol. Sci. Series 6* (2) : 1—10. 1959.

[2] Becker A. J., McCulloch E. A., Siminovitch L., Till J. E. The effect of differing demands for blood cell production on DNA synthesis by hemopoietic colony-forming cells of mice. *Blood*. 26 : 296—308. 1965.

[3] Becker A. J., McCulloch E. A., Till J. E. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 197 : 452—454. 1963.

[4] Boveri T. Ueber die Entstehung des Gegensatzes zwischen den Geschlechtszellen und den somatischen Zellen bei *Ascaris megalocephala*, nebst Bemerkungen zur Entwicklungsgeschichte der Nematoden. *Sitzungsber. Ges. Morphol. Physiol. Munchen*. 8 : 114—125. 1892.

[5] Bradley T. R., Metcalf D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 44 : 287—299. 1966.

[6] Bruce W. R., Meeker B. E., Valeriotte F. A. Comparison of the sensitivity of normal hemopoietic and transplanted lymphoma colony-forming cells to chemotherapeutic agents administered in vivo. *J. Natl. Cancer Inst.* 37 : 233—245. 1966.

[7] Civin C. I., Strauss L. C., Brovall C., Faekler M. J., Schwartz J. F., Shaper J. H. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hemopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J. Immunol.* 133 : 157—165. 1984.

[8] Cronkite E. P., Flidner T. M., Bond V. P., Robertson J. S. Anatomic and physiologic facts and hypotheses about hemopoietic proliferating systems. In: The kinetics of cellular proliferation. Ed. Stohlman F., jr. New York. Grune and Stratton. 1959.

[9] Curry J. L., Trentin J. J. Hemopoietic spleen colony studies. I. Growth and differentiation. *Developmental Biol.* 15 : 395—413. 1967.

[10] Dantschakoff W. Untersuchungen über die Entwicklung des Blutes und Bindegewebes bei den Vögeln. *Anatomische Hefte.* 37 : 471—589. 1908.

[11] Danchakoff V. Origin of blood cells. Development of the hematopoietic cells and regeneration of blood cells from the standpoint of the monophyletic school. *Anat. Rec.* 10 : 397—414. 1916.

[12] Dick J. E., Magli M. C., Huszar D., Phillips R. A., Bernstein A. Introduction of a selectable gene into primitive stem cells capable of long-term reconstitution of the hemopoietic system of W/W_v mice. *Cell.* 42 : 71—79. 1985.

[13] Eaves C. J. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood.* 125 : 2605—2613. 2015.

[14] Ehrlich P. Ueber die spezifischen Granulationen des Blutes. *Arch. Anat. Physiol.* 3 : 571—579. 1879.

[15] Fialkow P. J., Gartler S. M., Yoshida A. Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 58 : 1468—1471. 1967.

[16] Fowler J. H., Wu A. M., Till J. E., McCulloch E. A., Siminovitich L. The cellular composition of hemopoietic spleen colonies. *J. Cell Physiol.* 69 : 65—72. 1967.

[17] Godin I., Dieterlen-Lievre F., Cumano A. Emergence of multipotent hemopoietic cells in the yolk sac and paraaortic splanchnopleura in mouse embryos, beginning at 8.5 days postcoitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92 : 773—777. 1995.

[18] Haeckel E. *Natürliche Schöpfungsgeschichte.* 15th lecture. Berlin. Georg Reimer. 1868.

[19] Haeckel E. *Anthropogenie.* 3rd edn. Leipzig. Wilhelm Engelmann. 1877.

[20] Haecker V. Die Kerntheilungsvorgänge bei der Mesoderm- und Entodermbildung von Cyclops. *Arch. Mikrosk. Anat.* 39 : 556—581. 1892.

[21] Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37 : 614—636. 1965.

[22] Hayflick L., Moorhead P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25 : 585—621. 1961.

[23] Hogg N., Horton M. A. Myeloid antigens: new and previously defined clusters. Leucocyte typing III. In: Ed. McMichael A. J. Oxford. Oxford University Press. 1987.

[24] Jacobson L. O., Marks E. K., Robson M. J., Gaston E. O., Zirkle R. E. Effect of spleen protection on mortality following X-irradiation. *J. Lab. Clin. Med.* 34 : 1538—1543. 1949.

[25] Kay H. E. M. How many cell-generations? *Lancet.* 286 : 418—419. 1965.

[26] Keller G., Paige C., Gilboa E., Wagner E. F. Expression of a foreign gene in myeloid and lymphoid cells derived from multipotent haematopoietic precursors. *Nature.* 318 : 149—154. 1985.

[27] Kimble J. E., White J. G. On the control of germ cell development in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biol.* 81 : 208—219. 1981.

[28] Lajtha L. G. Cytokinetics and regulation of progenitor cells. *J. Cell. Physiol.* 67 : 133—147. 1966.

[29] Lajtha L. G., Oliver R., Ellis F. Incorporation of ³²P and adenine ¹⁴C into DNA by human bone marrow cells in vitro. *Brit. J. Cancer.* 8 : 367—379. 1954.

[30] Lajtha L. G., Oliver R., Gurney C. W. Kinetic model of a bone-marrow stem-cell population. *Brit. J. Haematol.* 8 : 442—460. 1962.

[31] Lajtha L. G. On the concept of the cell cycle. *J. Cell. Comp. Physiol.* 62 (Suppl. 1) : 143—145. 1963.

[32] Lorenz E., Uphoff D., Reid T. R., Shelton E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *Natl. Cancer Inst.* 12 : 197—201. 1951.

[33] Maximow A. Über embryonale Entwicklung der Blut- und Bindegewebszellen bei den Säugetieren. *Anat. Anz.* 32 : 65—72. 1908.

[34] Maximow A. Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. *Fol. Haematol.* 8 : 125—134. 1909.

[35] Mazurier F., Doedens M., Gan O., Dick J. E. Rapid myeloerithroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells. *Nature Med.* 9 : 959—963. 2003.

[36] McCulloch E. A., Till E. The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Radiation Res.* 13 : 115—125. 1960.

[37] Metcalf D., Foster R., Pollard M. Colony-stimulating activity of serum from germfree normal and leukemic mice. *J. Cell. Physiol.* 70 : 131—132. 1967.

[38] Metcalf D., Moore M. A. S. *Haemopoietic Cells*. *Frontiers of Biology*. Amsterdam—London. North Holland Publishing Co. 1971.

[39] Miller P. H., Knapp D. J., Eaves C. J. Heterogeneity in hematopoietic stem cell populations: implications for transplantation. *Curr. Opin. Hematol.* 20 : 257—264. 2013.

[40] Moore M. A. S., Metcalf D. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Brit. J. Haematol.* 18 : 279—296. 1970.

[41] Morrison S. J., Wandycz A. M., Hemmati H. D., Wright D. E., Weissman I. L. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development.* 124 : 1929—1939. 1997.

[42] Morrison S. J., Weissman I. L. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity.* 1 : 661—673. 1994.

[43] Neumann E. Hämatologische Studien III, Leukozyten und Leukaemie. *Arch. f. Mikrosk. Anatomie und Entwicklungsgeschichte.* 207 : 480—520. 1912.

[44] Ng A. P., Alexander W. S. Haematopoietic stem cells: past, present and future. *Cell Death Discovery.* 3 : 1—4. 2017.

[45] Noda S., Horiguchi K., Ichikawa H., Miyoshi H. Repopulating activity of ex vivo-expanded murine hematopoietic stem cells resides in the CD48-c-Kit⁺Sca-1⁺ lineage marker⁻ cell population. *Stem Cells.* 26 : 646—655. 2008.

[46] Nowell P. C., Cole U., Habermeyer J. G., Roan P. L. Growth and continued function of rat marrow cells in X-irradiated mice. *Cancer Res.* 16 : 258—261. 1956.

[47] Nowell P. C., Hungerford D. A. Chromosome studies in human leukemia. II. Chronic granulocytic leukemia. *J. Natl. Cancer Inst.* 27 : 1013—1035. 1961.

[48] Osgood E. E. A unifying concept of the etiology of the leukemias, lymphomas and cancers. *J. Nat. Cancer Inst.* 18 : 155—166. 1957.

[49] Pappenheim A. Zur Kenntnis und Würdigung der Methylgrün-Pyronin-Reaktin. *Fol. Haematol.* 5 : 51—65. 1908.

[50] Pappenheim A. Über die Entwicklung und Ausbildung der Erythroblasten. *Virchows Arch.* 145 : 587—643. 1896.

[51] Pluznik D. H., Sachs L. The cloning of normal «mast» cells in tissue culture. *J. Cell. Comp. Physiol.* 66 : 319—324. 1966.

[52] Ramalho-Santos M., Willenbring H. On the Origin of the Term «Stem Cell». *Cell Stem Cell.* 1 : 35—38. 2007.

[53] Reissmann K. R., Samorapoompichit S. Effect of erythropoietin on regeneration of hematopoietic stem cells after 5-fluorouracil administration. *J. Lab. Clin. Med.* 73 : 544—550. 1969.

[54] Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. A hypothesis. *Blood Cells.* 4 : 7—25. 1978.

[55] Siminovitch L., McCulloch E. A., Till J. E. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J. Cell. Comp. Physiol.* 62 : 327—336. 1963.

[56] Siminovitch L., Till J. E., McCulloch E. A. Decline in colony-forming ability of marrow cells subjected to serial transplantation into irradiated mice. *J. Cell. Comp. Physiol.* 64 : 23—32. 1964.

[57] Spangrude G. J., Heimfeld S., Weissman I. L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science.* 241 : 58—62. 1988.

[58] Stanley E. R., Metcalf D. Partial purification and some properties of the factor in normal and leukaemic human urine stimulating mouse bone marrow colony growth in vitro. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 47 : 467—483. 1969.

[59] Stewart F. M., Crittenden R. B., Lowry P. A., Pearson-White S., Quesenberry P. J. Long-term engraftment of normal and post-5-fluorouracil murine marrow into normal nonmyeloablated mice. *Blood.* 81 : 2566—2571. 1993.

- [60] *Till J. E., McCulloch E. A.* A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* 14 : 213—222. 1961.
- [61] *Till J. E., McCulloch E. A., Siminovitch L.* A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 51 : 29—36. 1964.
- [62] *Till J. E., McCulloch E. A.* Hemopoietic stem cell differentiation. *Biochim. Biophys. Acta.* 605 : 431—459. 1980.
- [63] *Trentin J. J.* Determination of bone marrow stem cell differentiation by stromal haemopoietic inductive microenvironments (HIM). *Am. J. Pathol.* 65 : 621—628. 1971.
- [64] *Van Zant G.* Studies of hematopoietic stem cells spared by 5-fluorouracil. *J. Exp. Med.* 159 : 679—690. 1984.
- [65] *Virchow R. L. K.* Cellular pathology 1859. Special ed. London. John Churchill. 1978.
- [66] *Weismann A.* Das Keimplasma. Eine Theorie der Vererbung. Jena. Gustav Fischer. 1892.
- [67] *Wilson E. B.* The cell in development and inheritance. New York. Macmillan. 1896.
- [68] *Worton R. G., McCulloch E. A., Till J. E.* Physical separation of hematopoietic stem cells differing in their capacity for self-renewal. *J. Exp. Med.* 130 : 91—103. 1969.
- [69] *Wu A. M., Till J. E., Siminovitch L., McCulloch E. A.* Cytological evidence for a relationship between normal hematopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system. *J. Exp. Med.* 127 : 455—464. 1968.

Поступила 16 X 2017