

ОСНОВЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ С ИСКУССТВЕННЫМИ МАТЕРИАЛАМИ

Глава 4.

Биологические ткани и жидкости. Реакции живой материи на искусственные материалы

4.16. Стволовые клетки. Терминология и классификация.

Краткая история вопроса

- Согласно Арей (L. Arey, 1974; основоположник современной эмбриологии), первой попыткой понять происхождение жизни и раннего развития человека очевидно была гипотеза Аристотеля (384-322 до н.э.): жизнь каждый раз возникает за счет спонтанной генерации **de novo** в матке матери.
- Опыты Луи Пастера в 1864 г. по выращиванию микроорганизмов доказали несостоятельность предположения Аристотеля.
- 1855 г. - Лейдиг (Leydig): новый организм образуется из предсуществующего организма
- Рудольф Вирхов (1858) уточнил это предположение и выдвинул свой постулат - все клетки организма возникают только из ранее существующих клеток.
- Термин "стволовая клетка" (СК) введен в 1908 г. А. А. Максимовым: отдельная группа клеток, обладающих способностью к самообновлению, пролиферации и дифференцировке в специализированные ткани.

Терминология

- Используются многочисленные варианты обозначения группы (пула) стволовых клеток: стволовые, камбиальные клетки, примитивные, прогениторные, родоначальные, прекурсоры, клетки-предшественники, гемоцитобласты и т.п.
- Терминология отражает возрастную иерархию стволовых клеток (СК).
- Имеет значение детерминация - постепенная утрата стволовыми клетками тотипотентности, мульти- и плюрипотентности с одновременным ограничением пролиферативного и дифференцировочного потенциала.
- Потентность – это способность стволовых клеток давать начало зрелым (специализированным, дифференцированным) клеточным линиям.
- Зигота – клетка, образующаяся при слиянии мужской и женской половых клеток и дающая начало развитию зародыша (эмбриона).
- Бластоциста - это ранний (на 4-7 день развития) эмбрион до его имплантации в эндометрий, состоящий из 30-150 клеток. Содержит внутреннюю клеточную массу, состоящую, главным образом, из эмбриональных стволовых клеток.



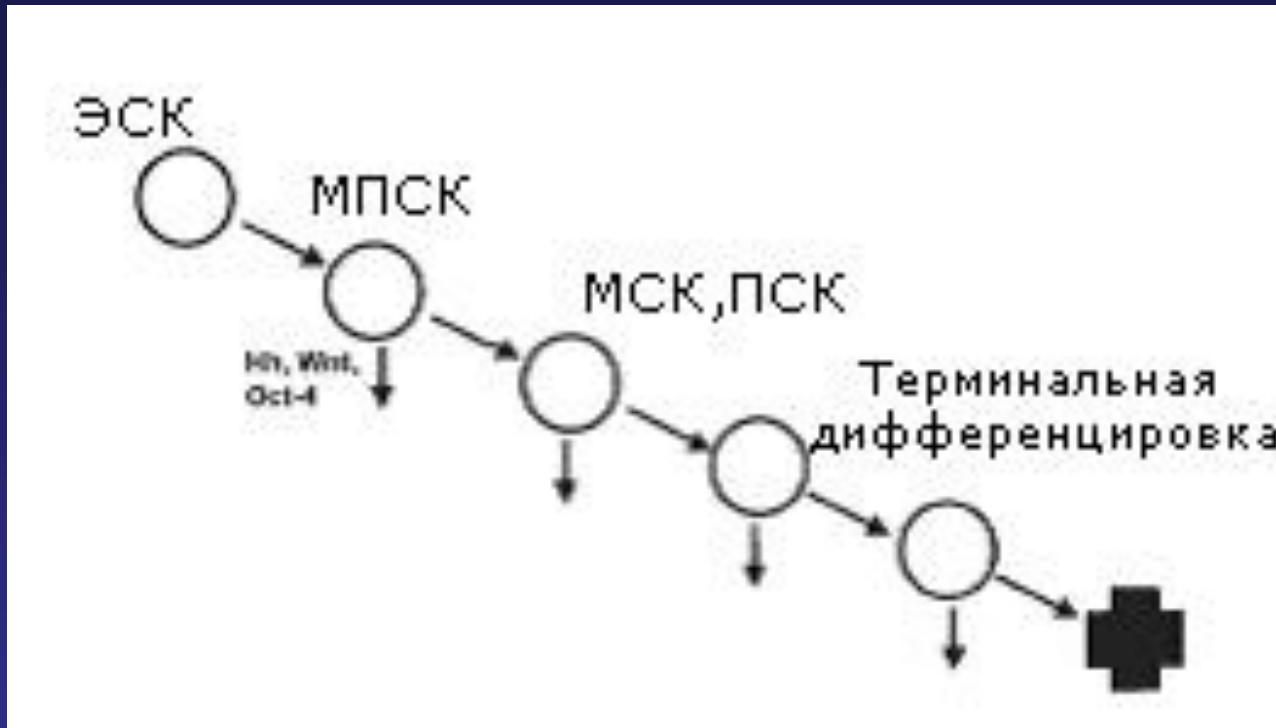
Классификация 2004



- **Пренатальные (эмбриональные) СК:**

- 1) Тотипотентные стволовые клетки (ТСК): клетки, формирующие целый организм и все известные типы клеток (около 300 типов). Истинной ТСК является оплодотворенная яйцеклетка, а в эмбриогенезе - клетки 2-8-клеточного бластомера, по некоторым данным - бластоцисты до размера 8-32 клетки (3-5 клеточных делений). Программа тотипотентности существует в ооците, зиготе и бластомерах.
- 2) плюрипотентные (до 11 дня после оплодотворения – гастрюляция, период имплантации зародыша в стенку матки): клетки эмбриона и внезародышевых оболочек. Способны образовывать практически все известные типы тканей.
- 3) мультипотентные клетки (до 8 недели развития эмбриона включительно): способны дифференцироваться в целостный орган или несколько типов тканей. Мультипотентные стволовые клетки (МПСК) образуют многие, но не все линии клеток, обычно в пределах зародышевого листка.

Постнатальные СК



- 1) Мультипотентные стволовые клетки (МПСК) . Пример: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) при определенных режимах культивирования дают начало 11 видам клеток *in vitro* (фиibroциты, кардиомиоциты, поперечнополосатые и гладкомышечные клетки, нервные (глиальные) клетки, остеоциты, хондроциты, теноциты, адипоциты, эндотелиальные клетки и стромальные элементы, формирующие гемопозиндуцирующее микроокружение) для соединительной ткани и ее производных, мышечной и нервной тканей.
- 2) Полипотентные стволовые клетки (ПСК) - образуют несколько типов клеток в пределах одного вида ткани. Пример: полипотентная стволовая кровяная клетка (ПСКК) дает начало всем клеткам крови (эритроциты, все виды лейкоцитов, тромбоциты).
- 3) Олигопотентные (тетра-, три-, би- и унипотентные) стволовые клетки-предшественники).

Региональные стволовые клетки

- Располагаются в определенных тканях и органах, как в зародышевый, так и в постнатальный периоды.
- Описаны гемопоэтические, эпидермальные, мезенхимальные, нейральные и печеночные стволовые клетки. Пример: стволовые клетки нервной ткани обнаруживаются в головном мозге, способны дифференцироваться в нейроны, астроциты, олигодендроциты.
- Могут быть мульти- или полипотентными. **Возможно, часть ЭСК остается в некоторых тканях организма.**
- Основные источники получения стволовых клеток для регенераторной медицины: эмбрион на разных стадиях (этические проблемы), пуповинная кровь, костный мозг, жировая ткань.

ЭСК в тканях

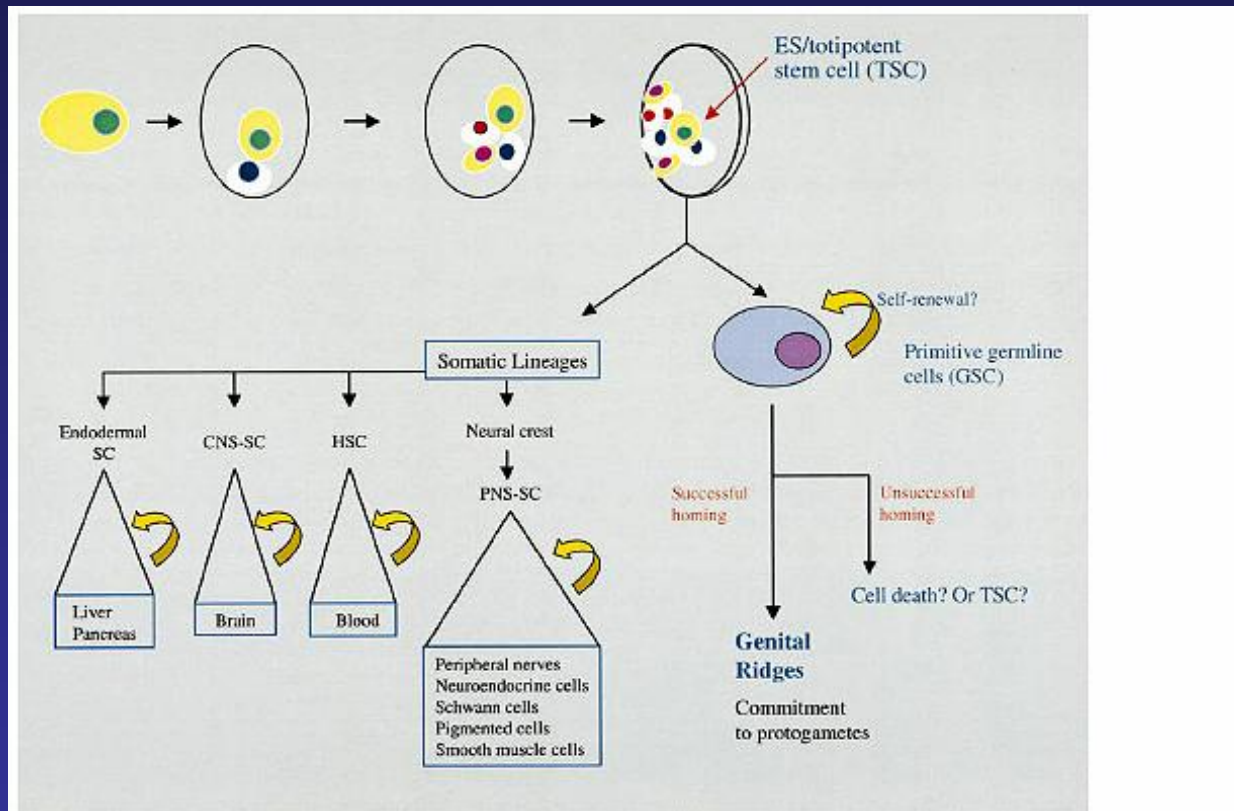


Figure 3. Model of TSC Generation of Germline and Somatic Progenitor Cells

Totipotent stem cells (TSCs) can diverge into GSCs and somatic stem cells (SSCs). A possible source of residual TSC is depicted. Although TSCs have not yet been identified or isolated either in the adult or in the embryo, it shall be important to identify the genes that regulate the outcomes of TSCs to somatic or germline stem cells.

Примеры региональных стволовых клеток



Основные типы региональных стволовых клеток во взрослом организме

Тип стволовых клеток	Локализация	Путь дифференцировки
Мезенхимальные	Костный мозг, жировая ткань	Кардиомиоциты, миоциты, гладкомышечные клетки, астроглия, костная, хрящевая, стромальная ткани, нервные клетки, эндотелий?
Кроветворные	Костный мозг, селезенка (грызуны)	Эритроциты, гранулоциты, моноциты-макрофаги, остеокласты, клетки Купфера, дендритные клетки, лимфоциты, тромбоциты
Нейральные	Головной мозг, кожа	Нейроны, астроциты, олигодендроциты, клетки крови
Эпителиальные	Кожа, эпидермис	Все типы клеток в эпителиальных криптах, все типы клеток эпидермального слоя
Печёночные	Печень	Гепатоциты, эпителий желчных протоков, кишечный эпителий, клетки поджелудочной железы, миоциты
Дермальные	Кожа, слизистые	Нейроны, глия, гладкие миоциты, адипоциты

Значение изучения ЭСК

- **Фундаментальное:** ЭСК является уникальной моделью для расшифровки времени и места действия генов развития человека и животных.
- **Прикладное:** источник пластического материала для регенеративной медицины.
- *Культивирование (масштабирование)* – это биотехнологический процесс увеличения количества (размножения) клеток в культуре
- *Клонирование* - это искусственное создание клеток, тканей, органов и живых существ с одинаковыми генетическими свойствами.

Эмбриональные стволовые клетки

из внезародышевых оболочек

- Открытие эмбриональных стволовых клеток связывают с именем Л. Стивенса (Stevens, 1950, 1953), который из клеток тератокарциномы (спонтанная опухоль яичников), обнаруживаемой в половых зачатках мышинных эмбрионов, выделил, наряду с опухолевыми, стволовые клетки.
- Пересаживание зародышевых клеток из эмбриональных половых бугорков взрослым сингенным мышам приводит к образованию тератокарциномы – это ограничивает использование ЭСК в клеточной терапии.
- Краткий курс эмбриологии: герментативные зародышевые стволовые клетки возникают на стадии гастрюляции во внезародышевых оболочках (трофобласт, амнион, желточный мешок), мигрируют из желточного мешка к половому бугорку, где впоследствии формируются половые органы зародыша. По некоторым данным, они сохраняются во взрослом состоянии.
- In vitro клетки тератокарциномы обнаруживали "аномалии поведения": росли неприкрепленными к подложке клонами плюрипотентных клеток, способных дифференцироваться в разнообразные линии соматических специализированных клеток: нервных, кожных, волосных, хрящевых, костных.
- Стивенс выдвинул постулат, что имеет дело со смешанной культурой раковых и эмбриональных стволовых клеток полового зачатка.
- Примесь эмбриональных нераковых клеток он назвал "эмбриональными плюрипотентными клетками" (ЭПК). Позднее удалось подсчитать, что в первичных линиях тератокарциномы содержится не более 0,1% ЭПК.
- Позднее во многих лабораториях мира были изолированы многочисленные линии ЭПК из разных образцов опухолевой ткани. Более 100 коммерческих линий ЭПК-производных тератокарцином мышей и человека продаются биотехнологическими компаниями с подробным клеточным паспортом.

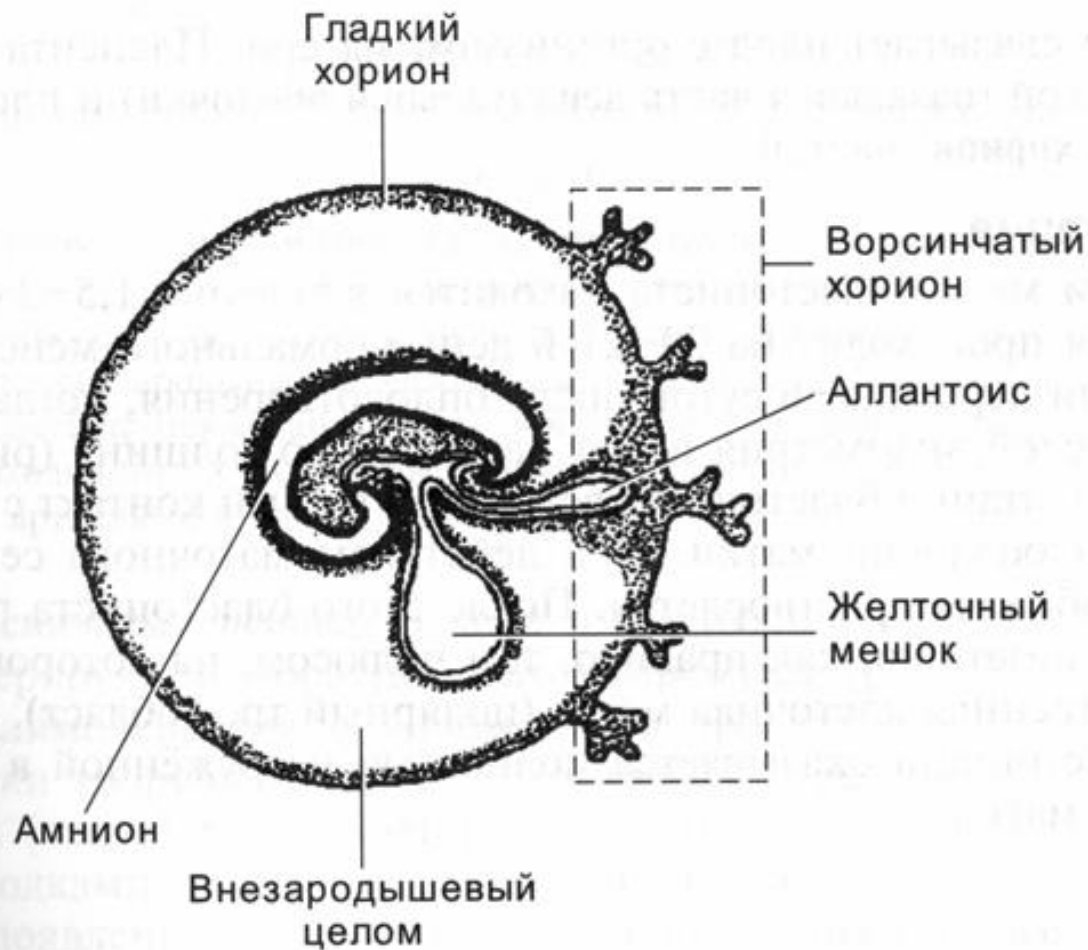
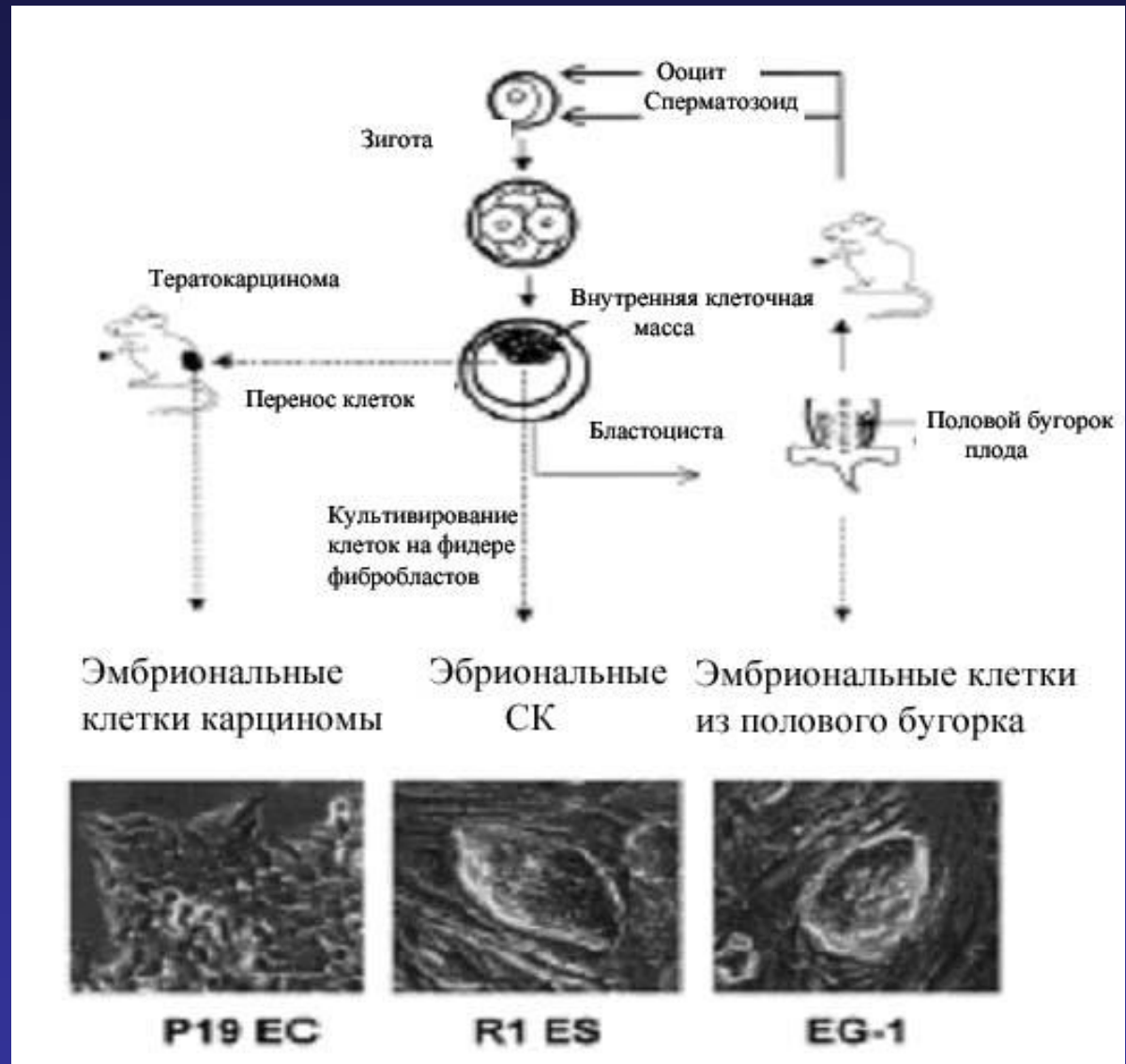


Рис. [] Внезародышевые оболочки. Зародыш находится в полости амниона. Желточный мешок связан с зачатком пищеварительной системы, а с каудальной её частью сообщается аллантоис. Все эти структуры находятся в эндоцеломической полости. Хорион топографически и структурно разделяется на гладкий и ворсинчатый. []

3 способа выделения ЭСК

- 1998 г. - Джеймс Томсон (J. Thomson), США - опубликовал в «Science» статью о выделении 5 бессмертных линий эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) из эмбриобласта бластоцисты человека
- Одновременно Джон Герхарт (J. Gerhard), США - в журнале «Анналы национальной академии США» описал метод выделения бессмертных линий ЭСК из полового бугорка 4-5 недельных эмбрионов мыши.



Условия получения “бессмертных” (пролиферирующих) линий ЭСК

- Жидкая культуральная среда
- Фидерный слой из фетальных фибробластов первых 3-х пассажей – блокируют взаимодействие ЭСК с подложкой
- Цитокины – ЛИФ (LIF), фактор роста стволовых клеток (SCF), ИЛ-3 или ИЛ-6.

Механизмы пролиферации и самоподдержания ЭСК

- Особенности фенотипа зародышевых клеток. Гетеродимерный комплекс рецептора, общий для связывания трех цитокинов (ЛИФ, ИЛ-6, ФСК), обеспечивает одновременную передачу сигнала через общую трансмембранную субъединицу gp-130 и Jak-Stat3 транскрипционный комплекс на "батарею" генов, контролирующую клеточный митоз. Оpoznающий домен Stat3 (SIE DNA-binding site) специфически взаимодействует с промотором c-fos на уровне ДНК хроматина. Нокаут (выключение) LIF-рецептора, либо Stat3 в ЭСК мышей вызывает необратимую остановку пролиферации клеток в присутствии LIF, SCF и IL-6.
- Функции фидерного слоя:
 - а) поддержание выживания ЭСК с помощью секретируемых цитокинов и ростовых факторов (в том числе блокирующих апоптоз);
 - б) блокада прямого контакта ЭСК с адгезивной подложкой;
 - в) формирование иммунологического барьера.
- Поддержание жизнеспособности клонов требует ЛИФ, ИЛ-6, ФСК. Размножение прогениторных клеток в культуре зависит от фактора роста фибробластов (ФРФ), фактора некроза опухоли (ФНО), трансформирующего фактора роста (ТФР), эндотелиального фактора роста (ЭнФР), фактора роста, высвобождающегося из тромбоцитов (ФРВТ), других цитокинов, интерлейкинов, макромолекул, гормонов и микроэлементов.

Техника получения ЭСК из бластоцисты

- Источник ЭСК – дубли предимплантационных бластоцист после успешного экстракорпорального оплодотворения.
- В питательной среде DI-MEM зародышей с помощью микроманипулятора разделяют на эмбриобласт и трофобласт, собирают клетки эмбриобласта, визуализируя их с помощью меченых антител.
- Эмбриобласт превращают в суспензию клеток с помощью диспазы/коллагеназы и выращивают в специальной питательной среде с добавлением трех цитокинов - ЛИФ, интерлейкин-6 (ИЛ-6) и фактор роста стволовых клеток (SCF).

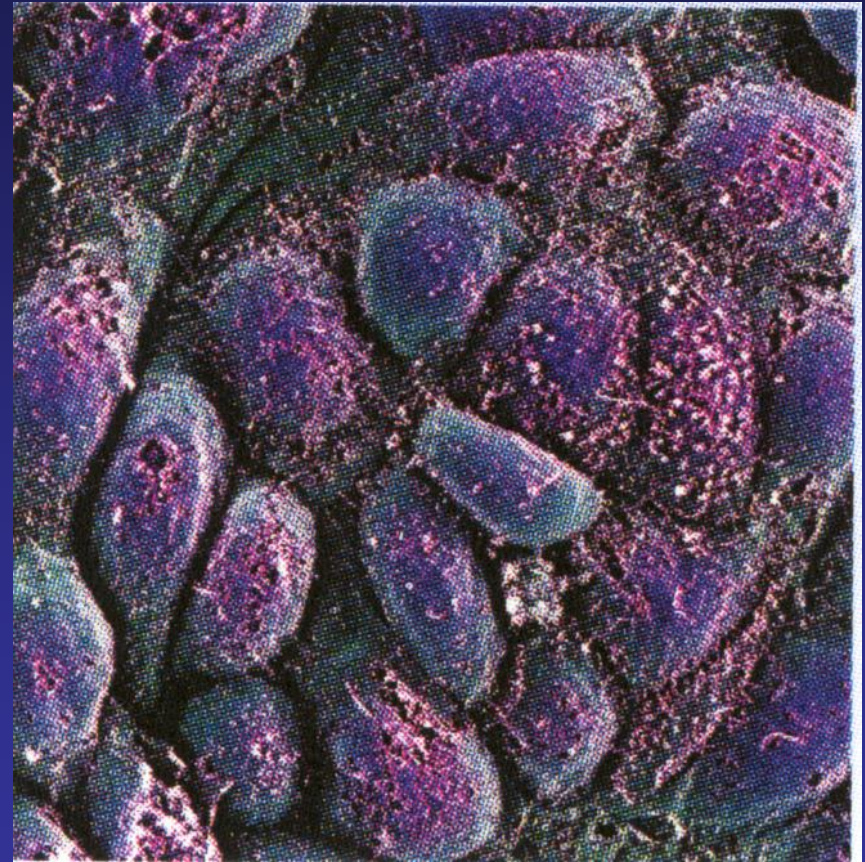


Рис. Имплантация. А — бластоциста перед имплантацией (4,5 сут); Б — начало имплантации. Клетки трофобласта, расположенные на эмбриональном полюсе бластоцисты (полярная область), на 5–6-е сутки проникают в слизистую оболочку матки.



Рост ЭСК в культуре

- ЭСК растут в жидкой фазе клонами, которые разбивают повторным легким пипетированием. Новые клоны возникают в суспензированной культуре через 5-7 дней.
- Каждый клон переносят в микроячейку и выращивают до агрегата из 40-50 клеток. Процедуру повторяют многократно в пассажах, увеличивая объем культуры до плотности 5-10 млн клеток на 6см чашку.
- Путем пассирования было изолировано **10** бессмертных клонов ЭСК человека, которые через **100** пассажей (2 года культивирования) сохранили высокую активность теломеразы, высокий темп клеточных делений, минимальный фенотип и тотальную плюрипотентность *in vitro* (способность дифференцироваться в любую из 350 специализированных линий - производных эктодермы, мезодермы и энтодермы).
- Инициация дифференцировки ЭСК происходит после смены среды, добавления сыворотки и удаления LIF. Обычно дифференцировка начинается с прикрепления клеток к подложке.
- При неограниченной пролиферации ЭСК человека устойчиво сохраняли кариотип в пассажах.



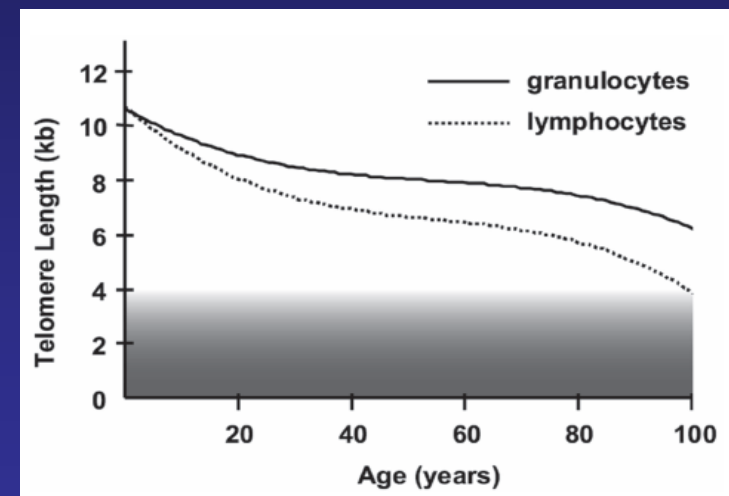
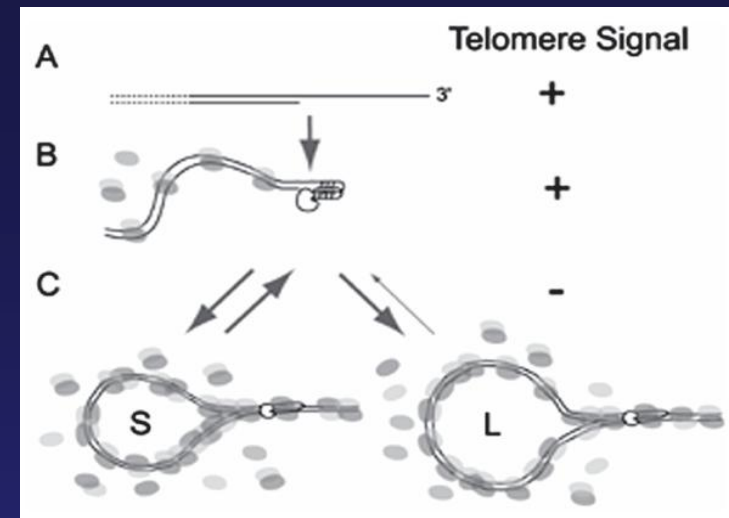
- Пролиферация клонов ЭСК в культуре имеет особенности. Каждый клон имеет одну стволовую клетку, которая подвергается асимметричному митозу. Только одна из дочерних клеток сохраняет место и статус бессмертной тотипотентной клетки. Вторая клетка делится и дифференцируется в прогениторные слои клеток.
- Прогениторные клетки делятся симметрично, обе дочерние клетки имеют сходную судьбу и неизбежно дифференцируются в зрелые узко специализированные линии.
- В центре клона ЭСК размножаются с меньшей скоростью, чем по периферии. Сначала наблюдается экспоненциальная фаза роста, переходящая в стадию равновесия вследствие гибели краевых клеток, вступающих в окончательную дифференцировку, и включения механизмов апоптоза.
- Число клеток в клоне не меняется, когда скорость пролиферации клеток уравновешена скоростью гибели и миграции одиночных клеток из клона.
- В отличие от специализированных соматических клеток, ЭСК сохраняют уникальную библиотеку генов без включения программ детерминации и коммитирования. Из 500 генов, ответственных за специализацию ЭСК, работает около 5%.

Запрет Хейфлика

- 1961 г. - Хейфлик и Мурхед (L. Hayflick. P. Moorhead) на культуре фибробластов человека показали, что в клетках существует механизм их старения, который лимитирует количество клеточных делений (не более 50-60). Позднее было показано, что в основе данного феномена лежит теломеразная активность клеток.
- ЭСК, как все активно делящиеся клетки, претерпевают 10^{-9} спонтанных мутаций на каждый нуклеотид.
- 2004 – журнал Nature Genetics опубликовал данные длительного культивирования 9 линий ЭСКч из коллекции NIH.
- Результат: 8 из 9 линий на поздних пассажах (55-59) несли одно или несколько генетических изменений, характерных для злокачественных клеток:
- 45 % - генные мутации (делеции или амплификации) в области проонкогенов;
- 22 % - мутации митохондриальной ДНК;
- 90 % - увеличение метилирования генных промотеров (эпигенетические изменения).
- Вывод: терапевтическое клонирование ЭСК требует минимального числа пассажей *in vitro*.

Теломераза

- Обнаружена Кэрл Грайдер в 1984 году.
- **Теломераза** — фермент (обратная транскриптаза, ДНК-полимераза), добавляющий особые повторяющиеся последовательности ДНК (ТТАГГГ у позвоночных) к 3'-концу цепи ДНК на участках теломер, которые располагаются на концах хромосом.
- Теломеры необходимы для инициации удвоения нитей ДНК. При каждом делении клетки теломерные участки сокращаются.
- В результате деятельности теломеразы, длина теломерных участков хромосом клетки увеличивается или сохраняется на постоянном уровне, компенсируя таким образом концевую недорепликацию - это позволяет клетке делиться неограниченно долго.
- Такой активной теломеразой обладают:
 - 1) стволовые клетки (прежде всего эмбриональные);
 - 2) половые клетки;
 - 3) опухолевые клетки (85 % рака);
 - 4) трансформированные клетки.
- Пример бессмертия раковых клеток — это клетки HeLa, изначально полученные из опухоли шейки матки Генриетты Лекс (Henrietta Lacks, отсюда название культуры HeLa) в 1951 г. Эта культура по сей день используется в лабораторных исследованиях.
- Клетки HeLa в самом деле бессмертны: по оценкам ежедневно производится несколько тонн этих клеток, причем все они являются потомками нескольких клеток, извлеченных из опухоли Г. Лекс.
- В соматических клетках активность теломеразы снижается, что является механизмом старения и смерти клетки (предел Хейфлика) и некоторых болезней (можно рассматривать как преждевременное старение:
 - апластическая анемия (Фанкони);
 - синдром Дауна;
 - Синдром преждевременного старения (**прогерия**).
- При введении гена теломеразы в клетки фибробластов человека, которые в норме делятся лишь 75-80 раз, они способны делиться 280 раз без признаков старения. Проблема: усиливается вероятность опухолевого перерождения клетки.



Причина канцерогенеза стволовых клеток на примере нейробластов дрозофилы

- За ассиметричное деление клеток отвечает группа генов – *caps, mira, pros, numb*.
- Мутации в этих генах нарушают ассиметричность деления и вызывают опухолевую гиперпролиферацию.

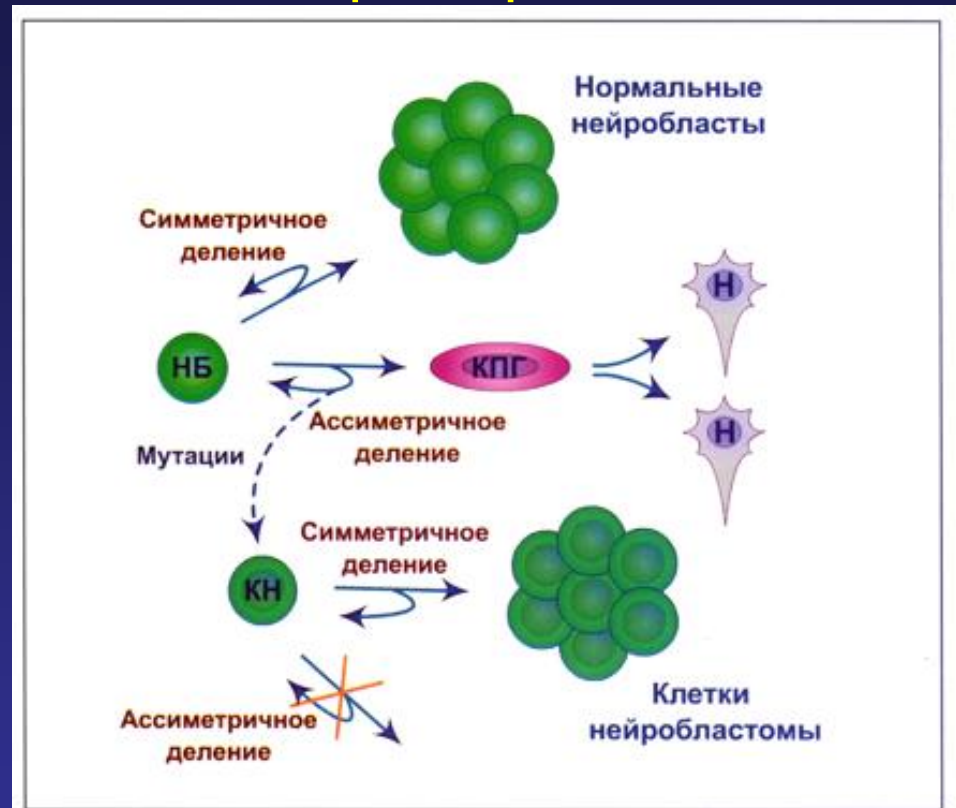


Рис. Схема развития злокачественной опухоли при нарушении генетического механизма ассиметричного деления стволовой клетки на примере нейробластов дрозофилы.
Обозначения: КН – клетка нейробластомы; КПГ – клетка-предшественник нейронов ганглиев; Н – нейрон; НБ – нейробласт

4 способ получения линий ЭСК – создание химер

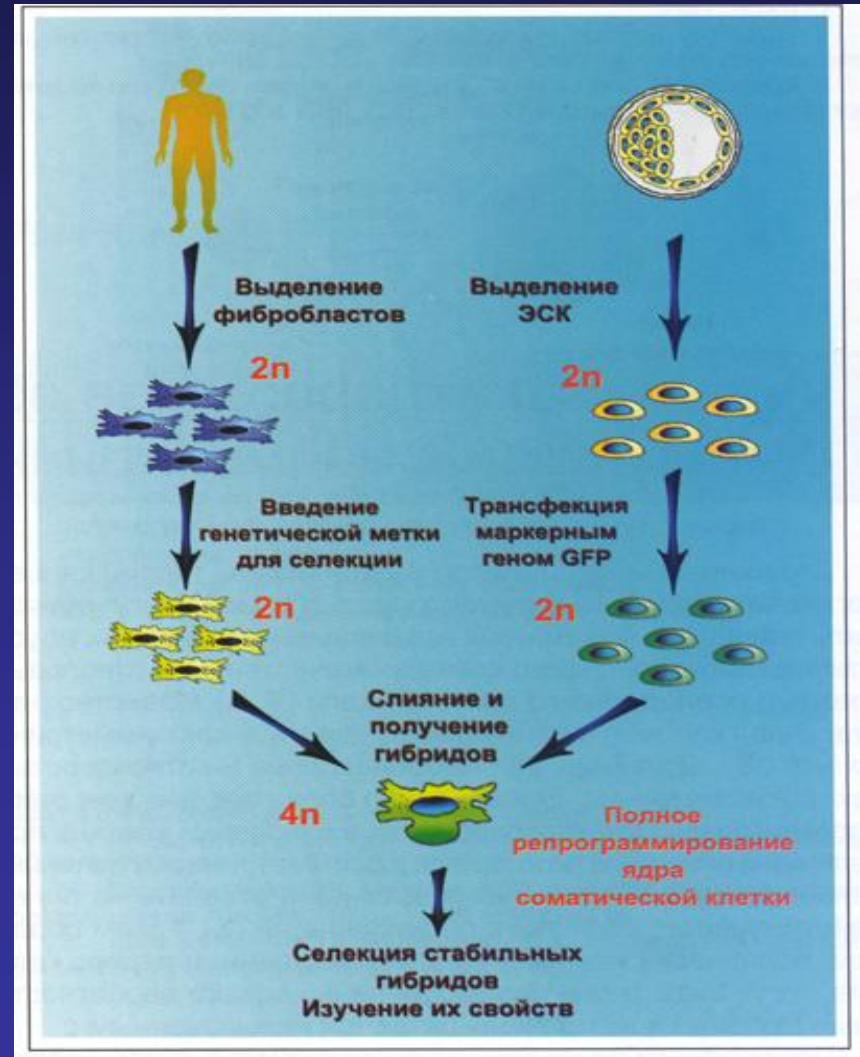
- Сотрудники Гарвардской медицинской школы предложили способ: соматическое клетки фетуса человека с помощью электрического разряда сливали с яйцеклеткой коровы, из которой предварительно удалялся пронуклеус. Метод позволяет получать гибридные бластоцисты, а из них – “бессмертные” ЭСК человека по методу Томпсона в обход беременности и фетальных тканей.
- Это позволяет избежать биоэтических проблем вокруг фетальной ткани и аборт. Однако ЭСК-цитогриды породили новые правовые и этические дискуссии. Неизвестны потенции, генетические возможности и жизнеспособность “межвидовых” зародышей, собранных из ядра человека и цитоплазмы коровы.
- Возникает риск передачи зоонозов и других латентных инфекций, включая, например, вирус бешенства коров.
- Тем не менее, в 2000 году в Австралии, Англии и Японии был отменен мораторий на государственные бюджетные исследования ЭСК человека, включая возможность получения ранних (100-120 клеточных) “межвидовых” цитогридов типа “человек-свинья”, “крыса-мышь”.



5 способ получения линий ЭСК - терапевтическое клонирование

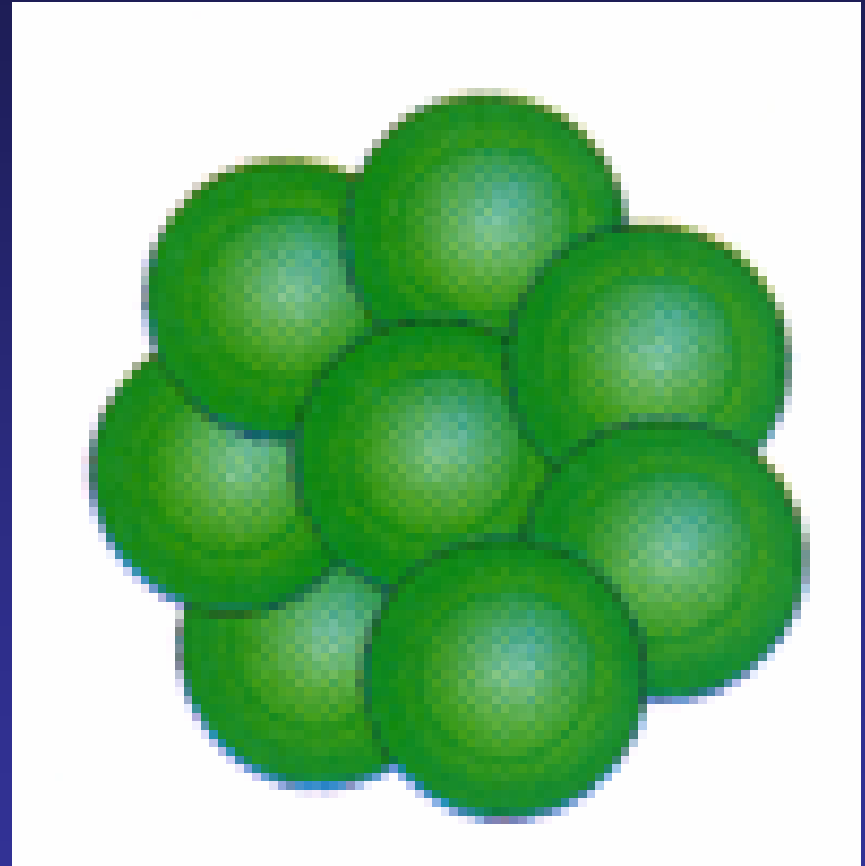


- Терапевтическое клонирование – перенос ядра соматической клетки в безъядерный ооцит для репрограммирования “взрослого” генома и искусственное создание эмбриона (на ранних стадиях) или индивидуальных линий ЭСК.
- В 1961-1964 г.г. Гурдон (J. Gurdon) получил первые клоны африканской шпорцевой лягушки путем введения клеточного ядра в энуклеированную яйцеклетку. При использовании ядер бластоцисты в 90% развивались нормальные головастики, при применении ядер из гаструлы - 20-30% здоровых организмов, остальные - уродливые, либо останавливались в своем развитии.
- При применении ядер из клеток эктодермы и мезодермы образовывались уродливые головастики с серьезными дефектами. Количество нормальных клонов было незначительно. Еще меньше здоровых лягушат возникало если использовали клетки от взрослых организмов (1:1000).
- Лаборатория Kevin Eggan (Гарвардский институт стволовой клетки) – первыми создали химическим способом гибрид из ЭСК и соматической клетки (фибробласт кожи человека) за счет слияния клеток.
- **Результат:** 1) репрограммирование на 99 % генома соматической (взрослой) клетки до эмбрионального состояния (маркеры ЭСК, 120 клеточных делений, плюрипотентность, образование тератом из клеток 3-х зародышевых листков при трансплантации мышам Nude).
- 2) ЭСК (как и яйцеклетка) способны нивелировать геномную и эпигеномную информацию соматического ядра.
- **Недостаток:** тетраплоидной набор хромосом мутантных клеток ограничивает их терапевтическое применение по многим позициям (иммуногенность, стабильность кариотипа при делениях и т.д.).
- **Перспектива:** перенос соматического ядра в энуклеированную ЭСК.



Морфология ЭСК

- Незрелые пролиферирующие ЭСК в клонах сохраняют ошаренную форму и не прикрепляются к подложке, потому что не имеют сформированного цитоскелета и рецепторов адгезии.
- Известно, что внутриклеточный остов клетки играет важную роль в проведении сигналов между плазматической мембраной и ядром, способствующих дифференцировке.
- Мышиные ЭСК растут плотными клонами мелких клеток с минимальной каемкой цитоплазмы, образуют максимальное число межклеточных контактов в клоне. ЭСК обезьян формируют более плоские колонии клеток с неровными краями. В ранних клонах легко просматриваются отдельные клетки. ЭСК человека дают наиболее крупные агрегаты с характерными оформленными краями.
- Пролиферирующие ЭСК не экспрессируют антигены главного комплекса гистосовместимости I и II типа.

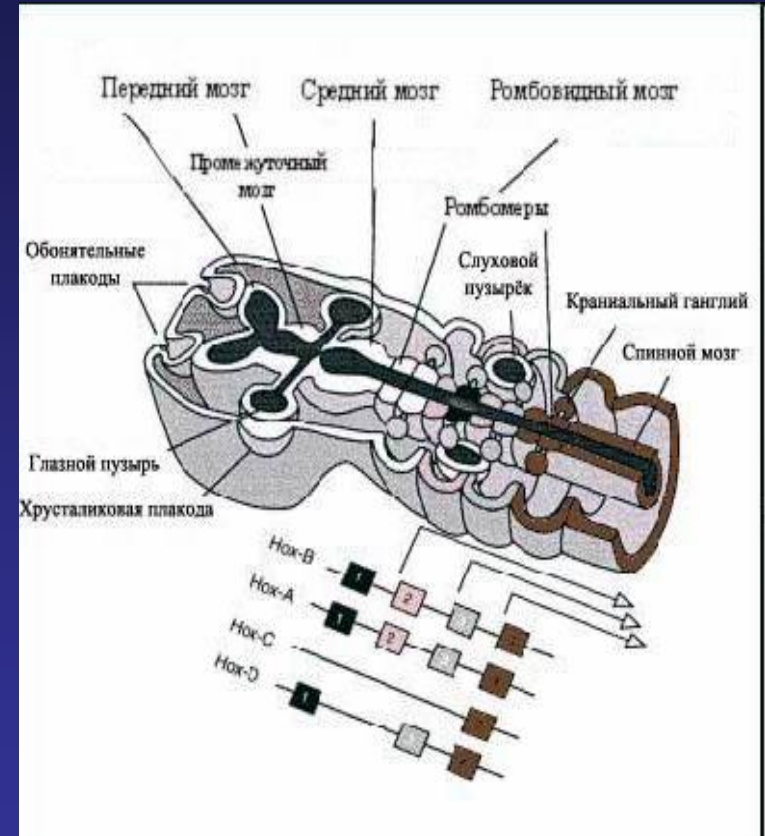


Фенотип ЭСК

- Пролиферирующие незрелые ЭСК пока идентифицируются скудным набором фенотипических маркеров: CD90, CD133, и CD117, HTERT (ген теломеразы человека), Oct4, Rex1, SSEA-4, TRA 1-60, GCTM-2, TRA1-81, и SSEA-3-has, щелочная фосфатаза, отсутствие бета-интегрин (молекула адгезии).
- Наиболее важные внутриклеточные маркерные белки: Oct3, Oct4, Tcf, Groucho, относящимся к так называемым белкам-сайленсерам хроматина. С их помощью происходит особая компактная упаковка гетерохроматина, препятствующая образованию петель эухроматина. Опосредованная этими белками упаковка хроматина коррелирует с тотипотентностью генома этих клеток.
- Внешний сигнал ЛИФ в синергизме с белком-сайленсером Oct3/Oct4 удерживают геном пролиферирующих ЭСК в тотипотентном состоянии. В бластоцисте мышей Oct4 экспрессирован только в эмбриобласте, но индуцирует экспрессию гена для ФРФ-4 в трофобласте.

ЭСК in vitro и эмбриогенез

- Около 100 лет назад (1894) У. Бейтсон выдвинул теорию **гомеозиса** – универсального пространственного плана развития зародыша. Развитие начинается с головных сегментов и заканчивается хвостовыми закладками согласно линейному расположению НОХ-генов. Впервые они описаны у мышей в 1984 г.
- У мышей и человека обнаружено 39 НОХ-генов. Программы сборки скелета, мышц, парных органов и головного мозга создаются разной комбинацией НОХ-генов в разных участках зародыша (НОХ-код).
- Комбинация **Hox** (**homeobox**)-генов (гены **гомеозиса**) предопределяет в эмбриогенезе:
 - 1) трехмерную топографию органов (нервной трубки), форму и размеры органа, включая численность клеток;
 - 2) порядок сборки паренхимы в функциональные единицы (дольки печени, нефрон, ворсинка с криптой, альвеола, островок Лангерганса и т.п.);
 - 3) создается своеобразное морфогенетическое поле, связывающее паренхиму и мезенхиму в процессе закладки сомитов, сегментации зародыша, формирования желточного мешка, аллантаоиса, других провизорных органов и тканей до размежевания территории между органами.
- НОХ-гены работают также до полового созревания, у взрослых – в период регенерации тканей.
- пролиферация ЭСК in vitro разобщена с включением Hox-генов гомеозиса. Следствие: неорганизованный рост клонов.



Удаление ЛИФ и фидера из культуры ЭСК

- Включаются "мастер гены" трех зародышевых листков
- В суспензионных агрегатах ЭСК спонтанная дифференцировка клеток идет топографически в обратном порядке по сравнению с эмбрионом: наружный слой дифференцируется в эндодерму, средний слой - в мезодерму, а "ядро" клона - в эктодерму.
- Функционирование ранних генов зародышевых листков идет в культуре хаотично, спонтанная дифференцировка нейронов, кардиомиоцитов, клеток кроветворения идет по укороченной программе без предварительного размножения региональных стволовых клеток.

Факторы дифференцировки ЭСК в специализированные линии

- линия ЭСК Н9 созревает в дериваты мезодермы под действием активина А и фактора роста нервов (ФРН). При добавлении фактора роста гепатоцитов (ФРГ) и ФРН-β развивались все три типа зародышевых листков; введение ФРФ-β, витамина Е и МБК-4 ингибирует развитие элементов эндодермы.
- в узком диапазоне концентраций ретиноевая кислота индуцирует нейрогенез, морфогенетический белок кости 2 типа (МБК-2) - образование эпителия эндодермы, трансформирующий фактор роста-β - преимущественно мышечные линии, ИЛ-6 - эритроидные линии, ИЛ-3 - моноцитарно-миелоидные линии клеток.



Регенеративная медицина

- **Регенеративная медицина** рассматривает средства и способы лечения, в том числе клеточные технологии, способствующие репарации или образованию новой ткани в поврежденных или патологически измененных тканях и органах.
- Актуальность: в 2000 г. потребность в клеточной терапии в США оценивалась (в год) для больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями - 5800000 человек, аутоиммунные болезни 30000000, диабет - 12000000, остеопороз - 10000000, онкологические больные - 8200000, болезнь Альцгеймера - 5500000, Паркинсона - 5500000 миллионов, серьезные ожоги - 300000, повреждения спинного мозга 250000 и пороки развития 150000. Во многом аналогичные тенденции наблюдаются в РФ.

Выращивание тканей in vitro

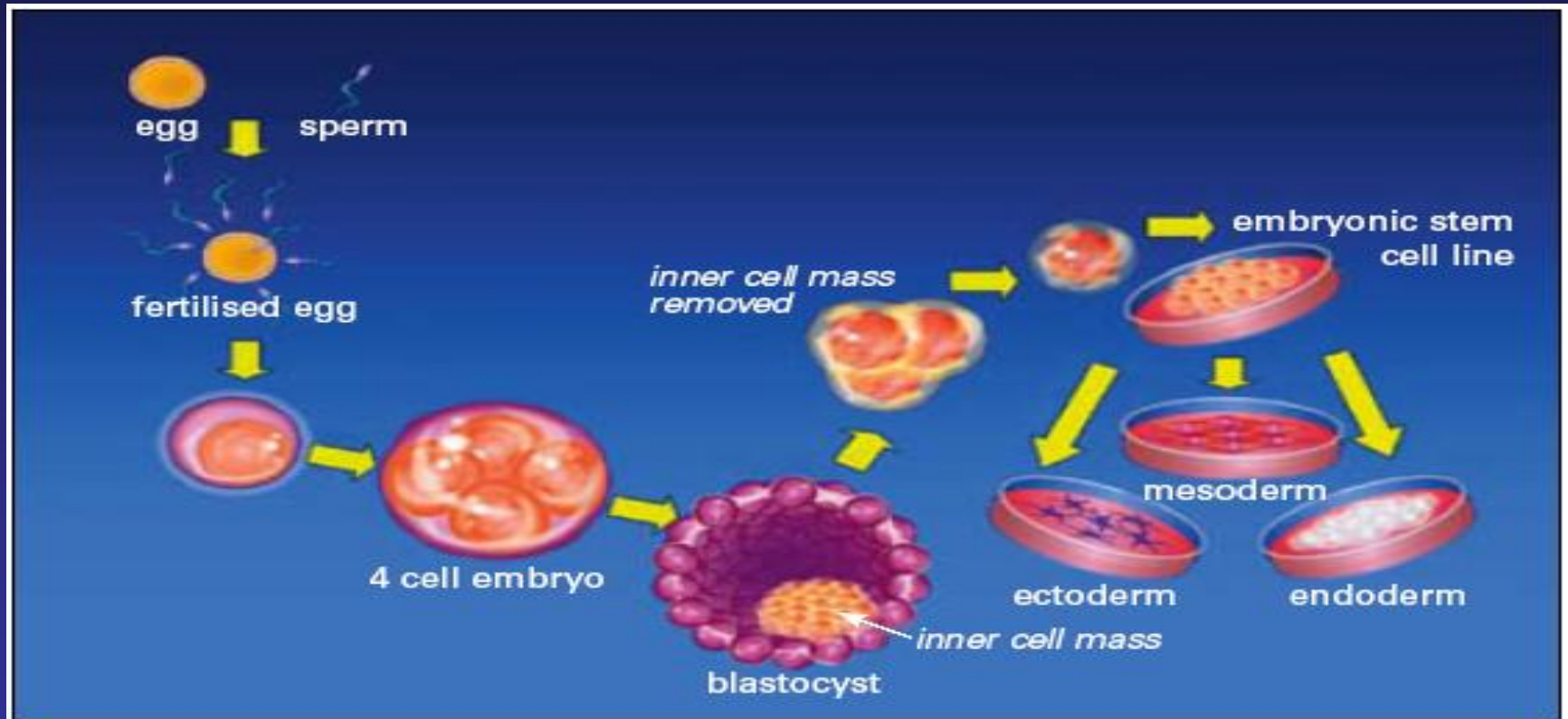


Figure 1. Fertilisation of the egg and sperm lead to the formation of a blastocyst, the inner cell mass of which is removed to create an embryonic stem cell line. The cells in this line are pluripotent and will differentiate under appropriate culture conditions into the three lineages of: ectoderm, endoderm and mesoderm, from which all mature cells will develop. Examples include nervous tissue, pancreas and heart respectively

Перспективы практического применения ЭСК в регенеративной медицине (клеточной терапии)

- Только в США выделены ЭСК из более чем 60 генетических различных бластоцист. Теоретически, если удастся разработать адекватные и воспроизводимые методы получения из них клеточных линий с направленной дифференцировкой, научно-обоснованное практическое применение ЭСК для лечения более 70 заболеваний сердечно-сосудистой системы, дегенеративных заболеваний, иммунодефицитов, травм и др. станет объективной реальностью.
- Минусы:
 - этические и религиозные аспекты работы на человеческих эмбрионах, пусть даже на самых ранних стадиях их развития;
 - вероятность превращения в опухолевые клетки, например, тератокарциномы.
 - при выживании и дифференцировке ЭСК в организме реципиента возникает иммунный конфликт с отторжением трансплантата либо РТПХ в зависимости от дозы клеток.

Клеточная терапия болезней на примере миокарда

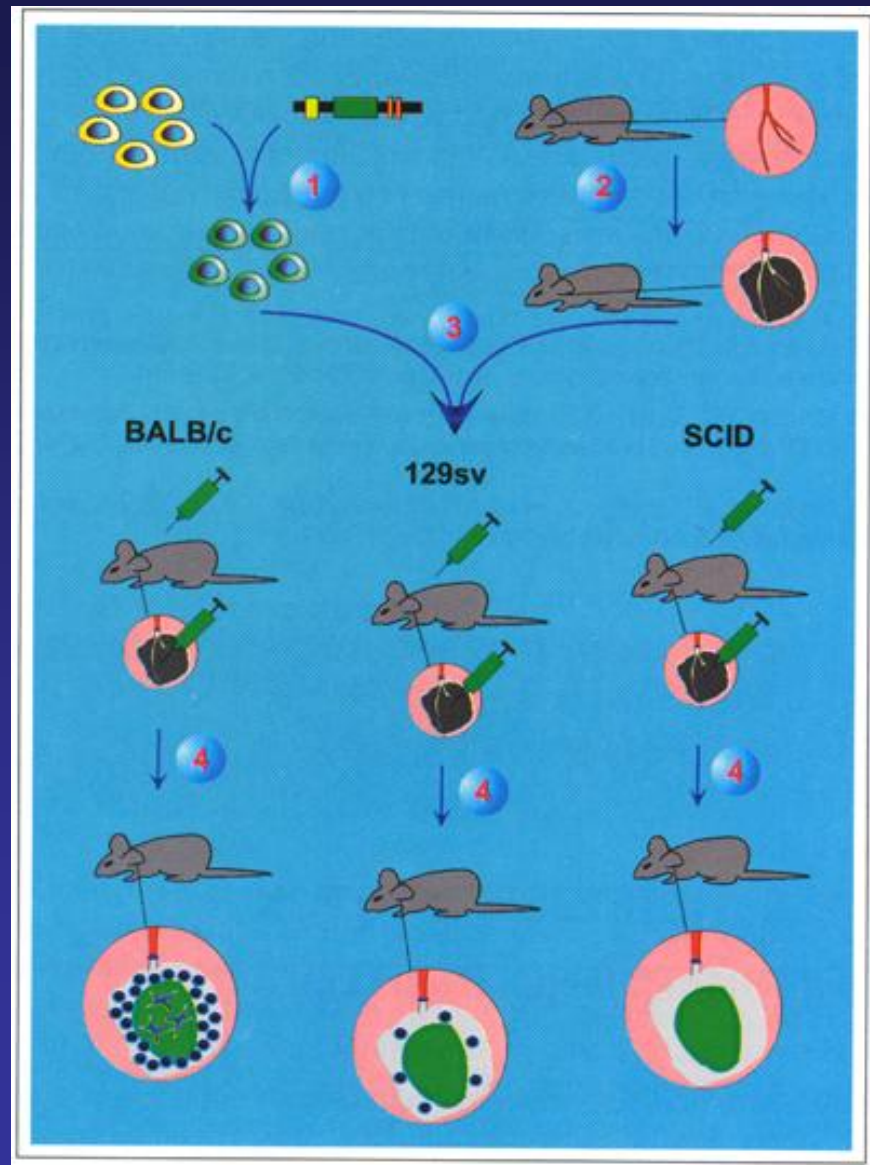
1. Оплодотворенная яйцеклетка (зигота)
2. Зигота делится надвое
- 3—4. Митотическое деление продолжается
5. Через 5 дней образуется бластоциста — шарик из клеток, наружный слой которого должен дать начало плаценте, а внутренний — всем тканям нового организма
6. Внутреннюю часть бластоцисты помещают на питательную среду
7. Используя разные химические сигналы, стволовые клетки превращают в клетки разных тканей: мышечные, эпителиальные, костного мозга и другие
8. Клетки — предшественники миоцитов (клеток сердечной мышцы) впрыскивают вблизи очага поражения, чтобы они устранили дефект

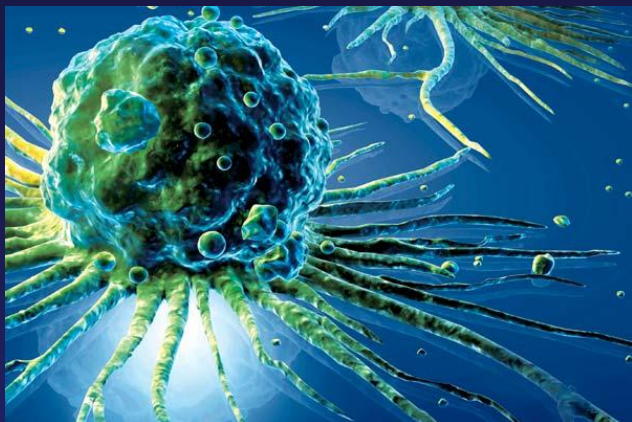


Доказательство иммуногенности ЭСК

Схема эксперимента:

1 – трансфекция ЭСК мыши линии 129sv вектором pEF-1 a-EGFP с получением колонии, экспрессирующей GFP;
2 – перевязка крупного артериального ствола сердца (left anterior descending artery) мышей с последующим получением экспериментального инфаркта миокарда;
3 – трансплантация трансфицированных ЭСК в область инфаркта миокарда трем линиям мышей (группа 1 – аллогенные мыши линии BALB/c, группа 2 – сингенные мыши линии 129sv, группа 3 – мыши с тяжелым комбинированным иммунодефицитом – SCID);
4 – гистологическое и гистохимическое исследование тканей сердца на 2-й неделе посттрансплантационного периода (мыши первой группы – выраженная инфильтрация Т-лимфоцитами и дендритными клетками, мыши второй группы – единичные лимфоциты в пограничных с инфарктом зонах миокарда, мыши третьей группы – полное отсутствие лимфоцитов и дендритных клеток).





«Обнадеживающих экспериментальных работ в области клеточной терапии множество. Того же, что можно назвать технологией, — результатов, подтвержденных рандомизированными (слепыми) многоцентровыми клиническими испытаниями, — просто нет», — резюме заведующего лабораторией молекулярной генетики

Института биологии гена РАН профессора Сергея Киселева.

*Спасибо
за внимание*