

«Клеточная инженерия»

Курс лекций кафедры фундаментальной медицины и биологии ВолгГМУ
для студентов медико-биологического факультета

Кость



Натуральный
киллер
НК клетка



T лимфоцит

Нейтрофил



Базофил

Прогениторная
клетка
лимфоидного



Тема лекции:

«Новейшие клеточные технологии. Стволовые клетки».

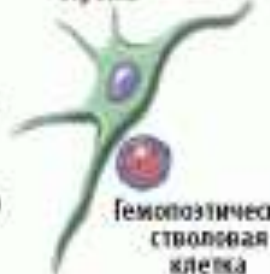


Стромальная
стволовая
клетка



Стволовые клетки скелетов мускулов
Стволовые клетки гепатоциты

Гемопоэтическая
поддерживающая
строма



Адиноцит
костного мозга



Стволовые клетки.

Стволовые клетки – недифференцированные (незрелые) клетки, обладающие свойствами:

Самообновление, то есть способность сохранять неизменный фенотип после деления (без дифференцировки).

Потентность (дифференцирующий потенциал), или способность давать потомство в виде специализированных типов клеток.

Новорожденные	20-25 лет	30-35 лет	50 -60 лет
1: 10 000	1 : 100 000	1: 300 000	1: 500 000

История изучения стволовых клеток в 20 веке

Дата	Событие
1908 год	Русский ученый Александр Максимов предлагает концепцию развития стволовой клетки.
июль-август 1963 года	Самый первый эксперимент с пуповинной кровью от 17 детей, которая была имплантирована взрослой женщине с метастазирующей саркомой. Наступило временное улучшение, но в марте 1964 года больная умерла. Исследователи хотели показать, что кровь новорожденных содержит факторы, подавляющие канцерогенез.
середина 60-х годов	Советские ученые Александр Фриденштейн (1924-1998), работавший в НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, и Иосиф Львович Чертков, и ныне работающий в Гематологическом центре РАМН, закладывают основы науки о стволовых клетках костного мозга.
начало 70-х годов	Лерой Стивенс впервые использует термин "эмбриональные стволовые клетки" — ЭСК.
80-е годы	Первая трансплантация стволовых клеток, полученных из периферической крови методом афереза.
1988 год	Элиан Глюкман в клинике Святого Людвига в Париже провела первую операцию по трансплантации пуповинной крови ребенку с анемией Фанкони.
1998 год	Американским ученым Джеймсу Томсону и Джону Беккеру удалось выделить человеческие эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и получить первые линии этих клеток. Плюрипотентность ЭСК, то есть способность дать начало, по меньшей мере, 350 различным типам клеток, послужила толчком к бурной исследовательской деятельности по изучению ЭСК и открыла широкие перспективы их практического использования в биологии и медицине, в первую очередь в трансплантологии, иммунологии и геронтологии.
1998 год	В США сделана пересадка нейральных стволовых клеток человеку после инсульта.
1999 год	В ведущих лабораториях Швейцарии началось исследование и тестирование препаратов эмбриональных стволовых клеток
1999 год	Журнал Science признал открытие стволовых клеток третьим по значимости событием в биологии после расшифровки двойной спирали ДНК и программы "Геном человека".

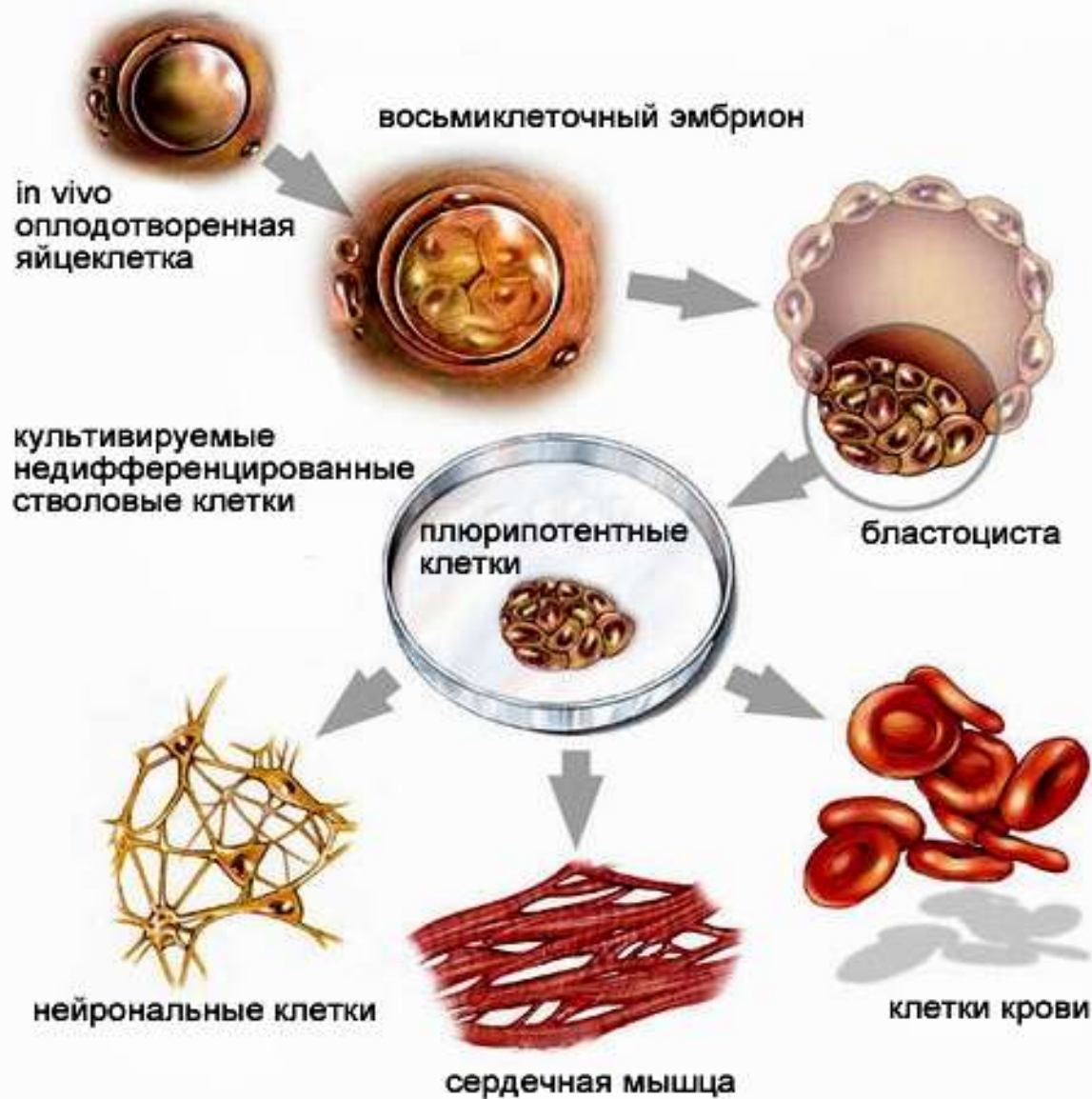
Классификация СК по способности к дифференцировке

Тотипотентные клетки способны формировать все эмбриональные и экстра-эмбриональные типы клеток. К ним относятся только оплодотворённый ооцит и бластомеры 2 - 8 клеточной стадии.

Плюрипотентные клетки способны формировать все типы клеток эмбриона. К ним относятся эмбриональные стволовые клетки, первичные половые клетки и клетки эмбриональных карцином.

Другие типы стволовых клеток локализуются в сформировавшихся тканях взрослого организма (adult stem cells). Они варьируют по способности к дифференцировке от мульти- до унипотентных.

Плюрипотентные клетки

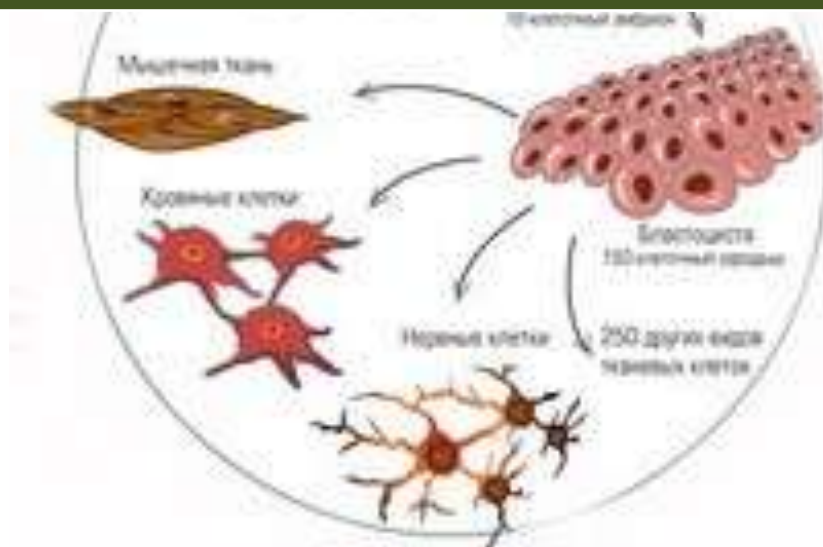


Классификация СК по источнику выделения

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) - внутриклеточная масса раннего эмбриона (на этапе бластоцисты 4-7 день развития).

Фетальные стволовые клетки - клетки зародыша на 9-12 неделе развития, выделенные из абортивного материала.

Стволовые клетки взрослого организма



СК взрослого организма

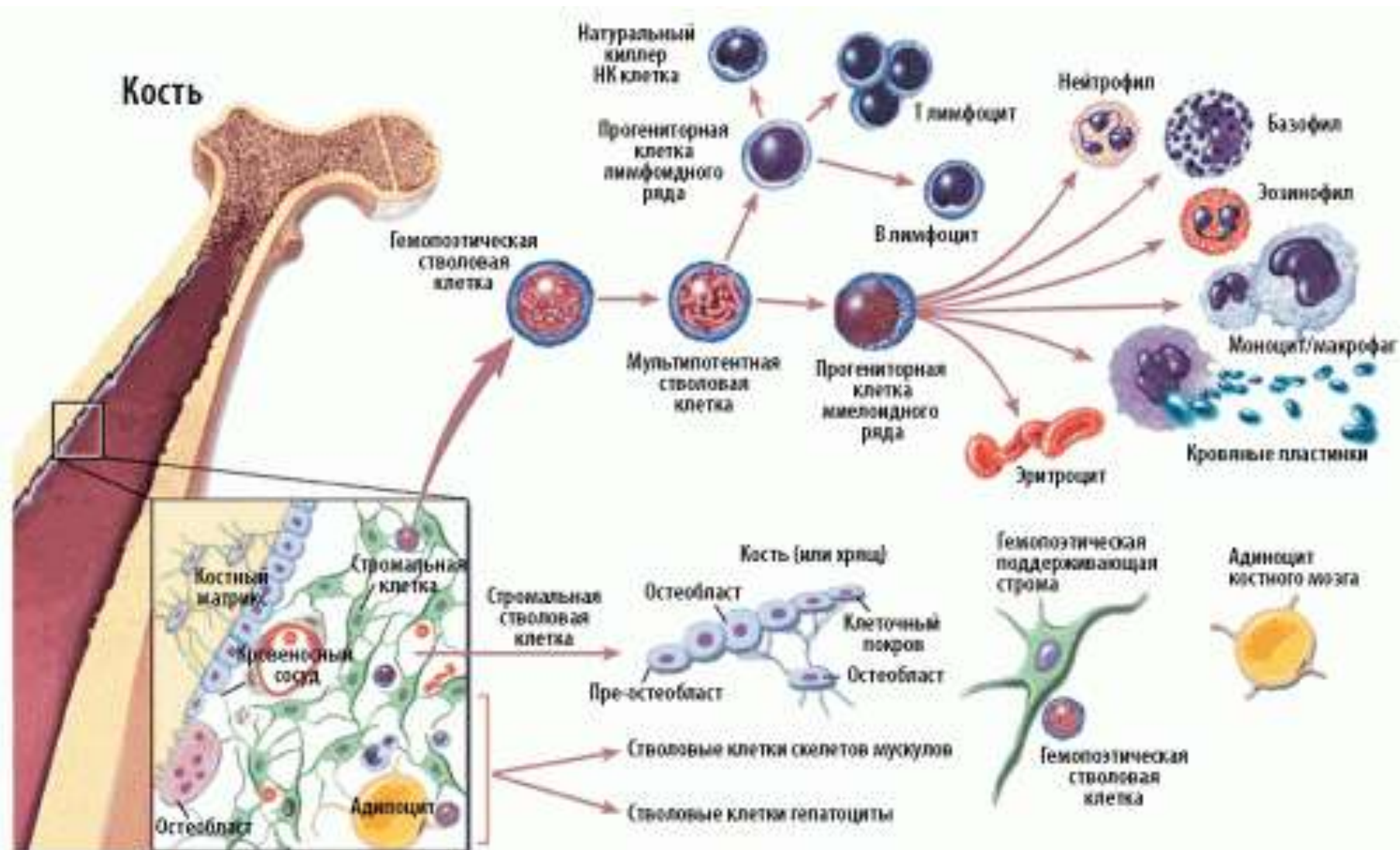
Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) - мультипотентные стволовые клетки, дающие начало всем клеткам крови: крови - эритроцитам, В-лимфоцитам, Т-лимфоцитам, нейтрофилам, базофилам, эозинофилам, и др

Мезенхимные стволовые клетки-мультипотентные региональные стволовые клетки, содержащиеся во всех мезенхимальных тканях (главным образом в костном мозге), способные к дифференцировке в различные типы мезенхимальных тканей, а так же в клетки других зародышевых слоёв.

Стромальные стволовые клетки - мультипотентные стволовые клетки взрослого организма, образующие строму костного мозга (поддерживающую гемопоэз), имеющие мезенхимальное происхождение.

Тканеспецифичные стволовые клетки - располагаются в различных видах тканей и в первую очередь, отвечают за обновление их клеточной популяции, первыми активируются при повреждении. Обладают более низким потенциалом, чем стромальные клетки костного мозга.

МСК



Тканеспецифичные СК

- Нейрональные стволовые клетки в головном мозге - дают начало трем основным типам клеток: нервным клеткам (нейронам) и двум группам не нейрональных клеток - астроцитам и олигодендроцитам.
- Стволовые клетки кожи - размещенные в базальных пластах эпидермиса и возле основы волосяных фолликулов, могут давать начало кератоцитам, которые мигрируют на поверхность кожи и формируют защитный слой кожи.
- Стволовые клетки скелетной мускулатуры - выделяют из поперечно полосатой мускулатуры., они способны к дифференцировке в клетки нервной, хрящевой, жировой и костной тканей, поперечнополосатой мускулатуры. Однако последние исследования показывают, что клетки скелетной мускулатуры, это не что иное, как мезенхимные стволовые клетки, локализованные в мышечной ткани.
- Стволовые клетки миокарда - способны дифференцироваться в кардиомиоциты и эндотелий сосудов.
- Стволовые клетки жировой ткани - обнаружены в 2001 году, проведенные с тех пор дополнительные исследования показали, что эти клетки могут превращаться и в другие типы тканей, из них можно выращивать клетки нервов, мышц, костей, кровеносных сосудов, или по крайней мере, клетки, имеющие свойства вышеперечисленных.
- Стромальные клетки спинного мозга (мезенхимальные стволовые клетки) дают начало разным типам клеток: костным клеткам (остеоцитам), хрящевым клеткам (хондроцитам), жировым клеткам (адипоцитам), а также другим типам клеток соединительной ткани.
- Эпителиальные стволовые клетки пищеварительного тракта расположены в глубоких складках оболочек кишечника и могут давать начало разным типам клеток пищеварительного тракта.


Источники для получения СК

- Пуповинная кровь новорожденного младенца;
- Костный мозг ребенка или взрослого человека;
- Периферическая кровь (из вены) после специальной стимуляции;
- Абортивный материал, полученный от женщин на 2 – 12 неделях беременности;
- Плоды на сроках 18 – 22 недели беременности, которые умерли в результате преждевременных родов, позднего выкидыша или аборта по социальным показаниям;
- Ткани недавно умерших здоровых людей (например, смерть наступила в результате травмы и т.д.);
- Жировая ткань взрослого человека или ребенка;
- Оплодотворение в пробирке яйцеклетки сперматозоидом с образованием зиготы.


Получение СК из пуповинной/ периферической крови/ КМ

1


Забор КМ(от 20 до 200 мл) в ходе пункции подвздошной кости у взрослых людей или грудины у детей. Забор периферической крови из вены. Забор пуповинной крови в стерильную пробирку прямо в родильном доме, из под перерезанной пуповины младенца.



Разделение в градиенте плотности фиколл-урографина. В результате чего на границе раздела фаз фиколла и урографина уплотняется и концентрируется тонкое кольцо стволовых клеток. Собирают СК.



Добавляют питательную среду и еще несколько раз откручивают на центрифуге, чтобы удалить все случайно попавшие в кольцо нестволовые клетки.



Готовые стволовые клетки или помещают в питательную среду для дальнейшего выращивания (культивирования), или замораживают в жидком азоте для длительного хранения, или ресуспендируют в физиологическом растворе и вводят в виде инъекции.

Получение СК из пуповинной/ периферической крови/ КМ

2

Забор КМ(от 20 до 200 мл) в ходе пункции подвздошной кости у взрослых людей или грудины у детей. Забор периферической крови из вены. Забор пуповинной крови в стерильную пробирку прямо в родильном доме, из под перерезанной пуповины младенца.

Лизирующий буфер – это специальный раствор со строго подобранными концентрациями солей, которые вызывают гибель всех клеток, кроме стволовых

Кровь или костный мозг смешивают с лизирующим буфером и оставляют на 15 – 30 минут, после чего откручивают на центрифуге чтобы удалить все случайно попавшие ненужные клетки

Готовые стволовые клетки или помещают в питательную среду для дальнейшего выращивания (культивирования), или замораживают в жидком азоте для длительного хранения, или ресуспендируют в физиологическом растворе и вводят в виде инъекции.

Основные направления использования СК



**Клеточная
терапия**



Трансплантация

Эксперимент 1

Зрелые СК мышцы
введены в поврежденный
миокард стенки ЛЖ



Зрелые СК

СК
способствуют
регенерации
поврежденного
миокарда

Поврежденные
кардиомициты

Зрелые костномозговые
клетки чел-ка введены
в кров.русло крысы

Эксперимент 2



СК индуцируют формирование новых
кров.сосудов в поврежденном
миокарде и пролиферацию уже
имеющейся сосудистой сети

Новые
кров.
сосуды

Поврежденные
кардиомициты

Зрелые
СК

Научные достижения

ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=ieCPCs

An updated version of PubMed is now available.
Come see the new improvements to the interface!

Format: Abstract ▾

Send to ▾

Cell Stem Cell. 2016 Mar 3;18(3):368-81. doi: 10.1016/j.stem.2016.02.001.

Expandable Cardiovascular Progenitor Cells Reprogrammed from Fibroblasts.

Zhang Y¹, Cao N¹, Huang Y², Spencer CJ², Fu JD³, Yu C¹, Liu K¹, Nie B¹, Xu T¹, Li K¹, Xu S¹, Bruneau BG⁴, Srivastava D⁵, Ding S⁶.

⊕ Author information

Abstract

Stem cell-based approaches to cardiac regeneration are increasingly viable strategies for treating heart failure. Generating abundant and functional autologous cells for transplantation in such a setting, however, remains a significant challenge. Here, we isolated a cell population with extensive proliferation capacity and restricted cardiovascular differentiation potentials during cardiac transdifferentiation of mouse fibroblasts. These induced expandable cardiovascular progenitor cells (ieCPCs) proliferated extensively for more than 18 passages in chemically defined conditions, with 10(5) starting fibroblasts robustly producing 10(16) ieCPCs. ieCPCs expressed cardiac signature genes and readily differentiated into functional cardiomyocytes (CMs), endothelial cells (ECs), and smooth muscle cells (SMCs) in vitro, even after long-term expansion. When transplanted into mouse hearts following myocardial infarction, ieCPCs spontaneously differentiated into CMs, ECs, and SMCs and improved cardiac function for up to 12 weeks after transplantation. Thus, ieCPCs are a powerful system to study cardiovascular specification and provide strategies for regenerative medicine in the heart.

Copyright © 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

Comment in

Expansion of cardiac progenitors from reprogrammed fibroblasts as potential novel cardiovascular therapy. [Stem Cell Investig. 2016]

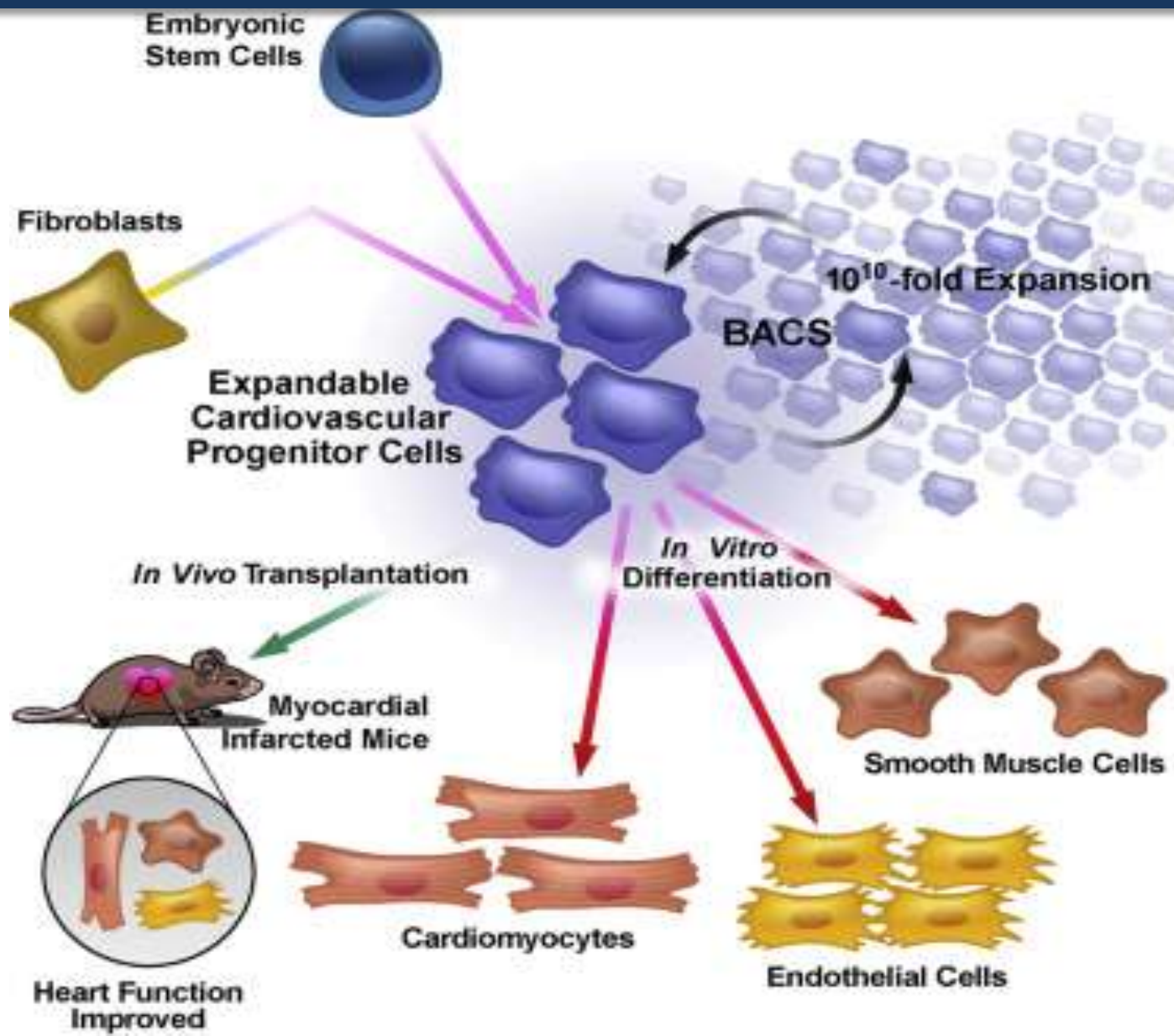
Comment on: Expandable cardiovascular progenitor cells reprogrammed from fibroblasts. [Stem Cell Investig. 2016]

PMID: 26942852 PMCID: [PMC5826660](#) DOI: [10.1016/j.stem.2016.02.001](#)

[Indexed for MEDLINE] [Free PMC Article](#)



Научные достижения



Научные достижения

ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18450476

An updated version of PubMed is now available.
Come see the new improvements to the interface!

Format: Abstract ▾

Send to ▾

Mol Cell Neurosci. 2008 Jun;38(2):245-58. doi: 10.1016/j.mcn.2008.02.014. Epub 2008 Mar 18.

Long-term tripotent differentiation capacity of human neural stem (NS) cells in adherent culture.

Sun Y¹, Pollard S, Conti L, Toselli M, Biella G, Parkin G, Willatt L, Falk A, Cattaneo E, Smith A.

⊕ Author information

Abstract

Stem cell lines that provide a renewable and scalable supply of central nervous system cell types would constitute an invaluable resource for basic and applied neurobiology. Here we describe the generation and long-term expansion of multiple human foetal neural stem (NS) cell lines in monolayer culture without genetic immortalization. Adherent human NS cells are propagated in the presence of epidermal growth factor (EGF) and fibroblast growth factor 2 (FGF2), under which conditions they stably express neural precursor markers and exhibit negligible differentiation into neurons or glia. However, they produce astrocytes, oligodendrocytes, and neurons upon exposure to appropriate differentiation factors. Single cell cloning demonstrates that human NS cells are tripotent. They retain a diploid karyotype and constant neurogenic capacity after over 100 generations. In contrast to human neurospheres, we observe no requirement for the cytokine leukaemia inhibitory factor (LIF) for continued expansion of adherent human NS cells. Human NS cells can be stably transfected to provide reporter lines and readily imaged in live monolayer cultures, creating the potential for high content genetic and chemical screens.

PMID: 18450476 DOI: [10.1016/j.mcn.2008.02.014](https://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.02.014)

Научные достижения

ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22272239

An updated version of PubMed is now available.
Come see the new improvements to the interface!

Format: Abstract ▾

Send to ▾

PLoS One. 2012;7(1):e29597. doi: 10.1371/journal.pone.0029597. Epub 2012 Jan 17.

Capture of neuroepithelial-like stem cells from pluripotent stem cells provides a versatile system for in vitro production of human neurons.

Falk A¹, Koch P, Kesavan J, Takashima Y, Ladewig J, Alexander M, Wiskow O, Taylor J, Trotter M, Pollard S, Smith A, Brüstle O.

⊕ Author information

Abstract

Human embryonic stem cells (hESC) and induced pluripotent stem cells (iPSC) provide new prospects for studying human neurodevelopment and modeling neurological disease. In particular, iPSC-derived neural cells permit a direct comparison of disease-relevant molecular pathways in neurons and glia derived from patients and healthy individuals. A prerequisite for such comparative studies are robust protocols that efficiently yield standardized populations of neural cell types. Here we show that long-term self-renewing neuroepithelial-like stem cells (It-NES cells) derived from 3 hESC and 6 iPSC lines in two independent laboratories exhibit consistent characteristics including i) continuous expandability in the presence of FGF2 and EGF; ii) stable neuronal and glial differentiation competence; iii) characteristic transcription factor profile; iv) hindbrain specification amenable to regional patterning; v) capacity to generate functionally mature human neurons. We further show that It-NES cells are developmentally distinct from fetal tissue-derived radial glia-like stem cells. We propose that It-NES cells provide an interesting tool for studying human neurodevelopment and may serve as a standard system to facilitate comparative analyses of hESC and hiPSC-derived neural cells from control and diseased genetic backgrounds.

PMID: 22272239 PMCID: [PMC3260177](#) DOI: [10.1371/journal.pone.0029597](#)

[Indexed for MEDLINE] [Free PMC Article](#)



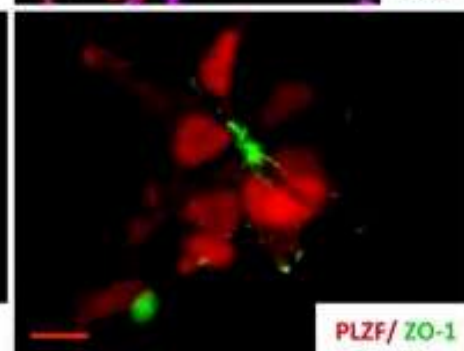
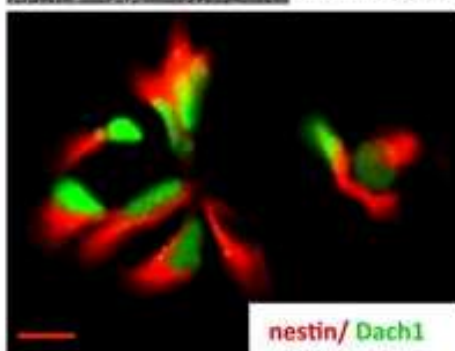
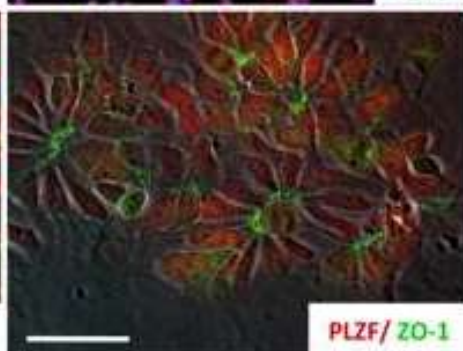
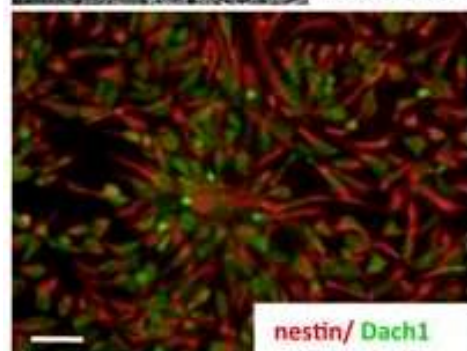
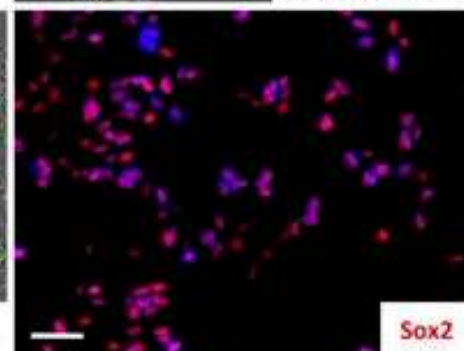
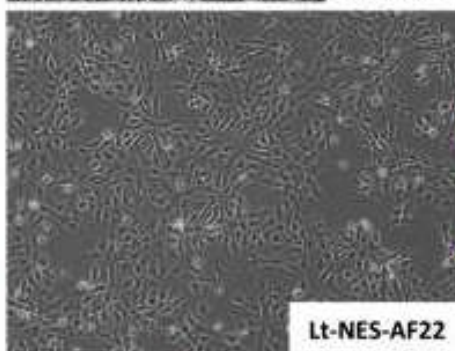
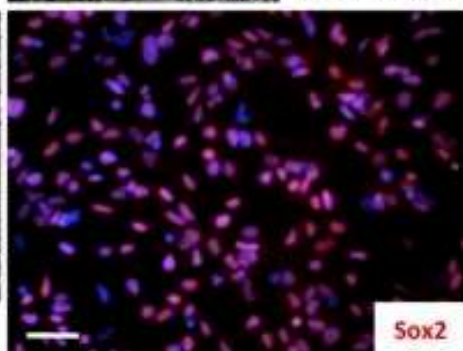
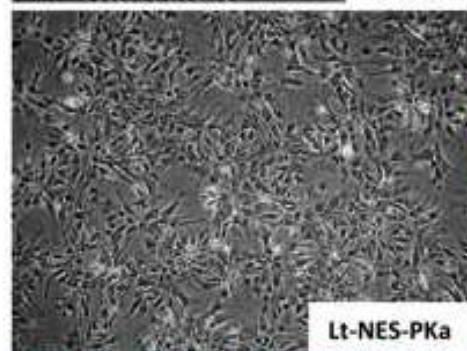
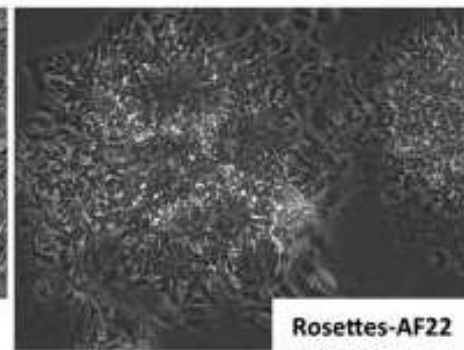
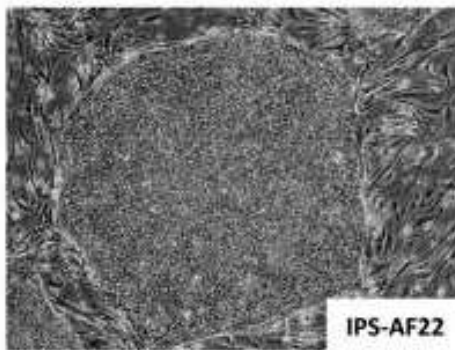
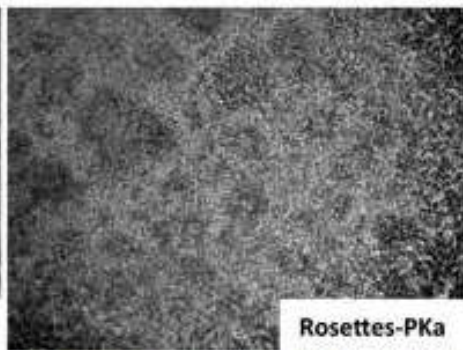
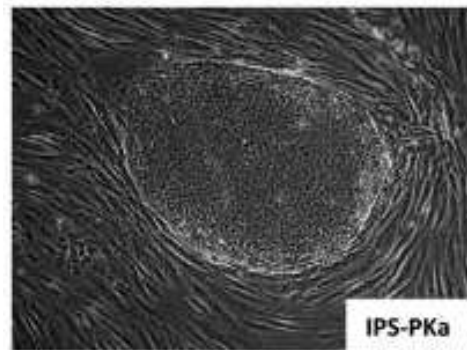
Images from this publication. [See all images \(6\)](#) [Free text](#)



Научные достижения

PKa

AF22



Научные достижения

ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30487128

An updated version of PubMed is now available.
Come see the new improvements to the interface!

Format: Abstract ▾

Send to ▾

Blood. 2019 Feb 14;133(7):633-643. doi: 10.1182/blood-2018-04-842641. Epub 2018 Nov 28.

Megakaryocytes and platelets from a novel human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell line.

Tozawa K¹, Ono-Uruga Y², Yazawa M³, Mori T^{4,5}, Murata M⁶, Okamoto S¹, Ikeda Y^{1,7}, Matsubara Y^{2,6}.

⊕ Author information

Abstract

The clinical need for platelet transfusions is increasing; however, donor-dependent platelet transfusions are associated with practical problems, such as the limited supply and the risk of infection. Thus, we developed a manufacturing system for platelets from a donor-independent cell source: a human adipose-derived mesenchymal stromal/stem cell line (ASCL). The ASCL was obtained using an upside-down culture flask method and satisfied the minimal criteria for defining mesenchymal stem cells (MSCs) by The International Society for Cellular Therapy. The ASCL showed its proliferation capacity for ≥ 2 months without any abnormal karyotypes. The ASCL was cultured in megakaryocyte induction media. ASCL-derived megakaryocytes were obtained, with a peak at day 8 of culture, and ASCL-derived platelets (ASCL-PLTs) were obtained, with a peak at day 12 of culture. We observed that CD42b⁺ cells expressed an MSC marker (CD90) which is related to cell adhesion. Compared with peripheral platelets, ASCL-PLTs exhibit higher levels of PAC1 binding, P-selectin surface exposure, ristocetin-induced platelet aggregation, and ADP-induced platelet aggregation, as well as similar levels of fibrinogen binding and collagen-induced platelet aggregation. ASCL-PLTs have lower epinephrine-induced platelet aggregation. The pattern of in vivo kinetics after infusion into irradiated immunodeficient NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ mice was similar to that of platelet concentrates. ASCL-PLTs have similar characteristics to those of peripheral platelets and might have an additional function as MSCs. The establishment of the ASCL and its differentiation into ASCL-PLTs do not require gene transfer, and endogenous thrombopoietin is used for differentiation. The present protocol is a simple method that does not require feeder cells, further enhancing the clinical application of our approach.

© 2019 by The American Society of Hematology.

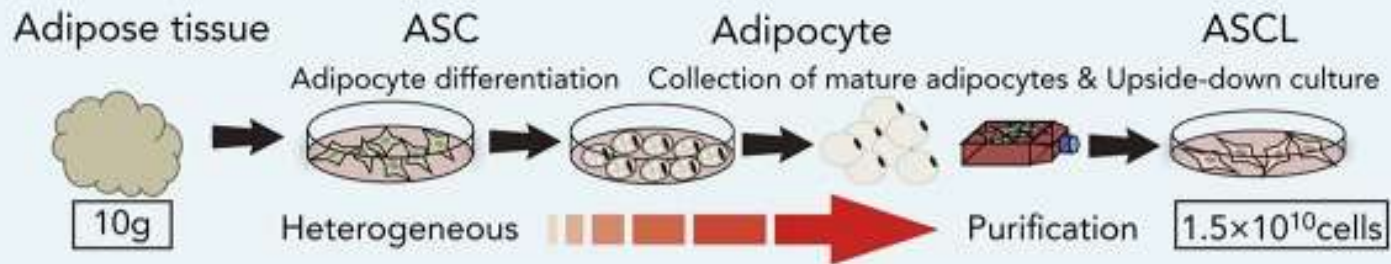
Comment in

Megakaryocytes from fat: a new recipe for platelets. [*Blood*. 2019]

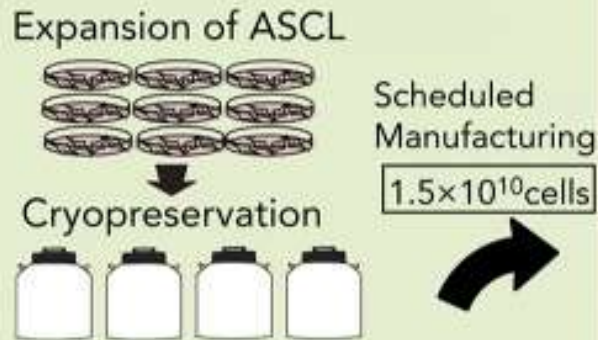
PMID: 30487128 PMCID: [PMC6384188](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC6384188/) DOI: [10.1182/blood-2018-04-842641](https://doi.org/10.1182/blood-2018-04-842641)

Научные достижения

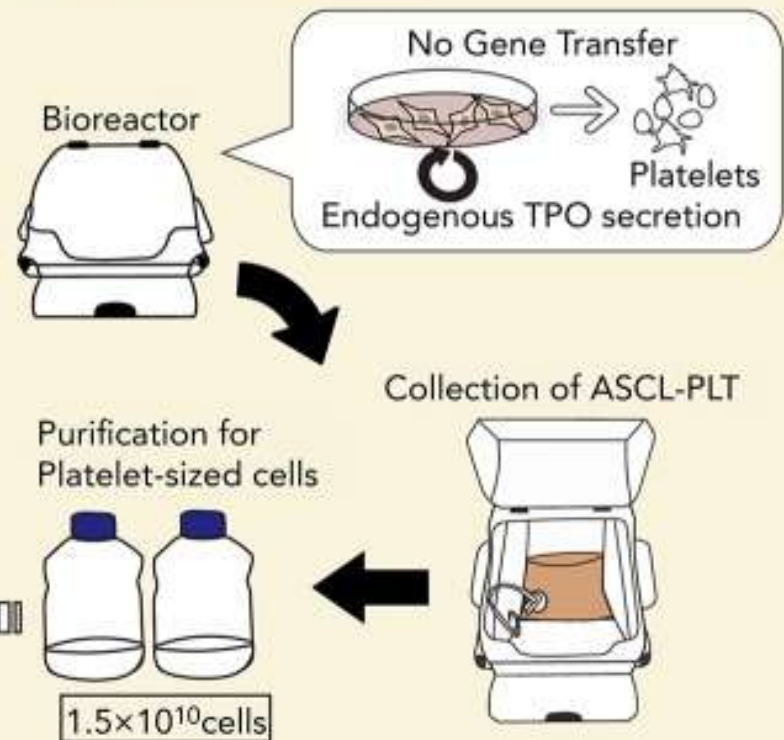
I. Establishment of ASCL



II. Expansion and Cryopreservation



III. ASCL-PLT Production



IV. Future Direction

