The background of the slide is a photograph of a modern, multi-story medical building with a curved facade and large glass windows. Two flags are flying on tall poles in front of the building: the Russian national flag on the left and a red flag with a white emblem on the right. The sky is clear and blue.

Стволовые клетки в современной медицине: Наука и клиника

Анна Борисовна Малашичева

к.б.н. зав. НИЛ Молекулярной кардиологии
Институт Молекулярной биологии и генетики НМИЦ им.
Алмазова
Доцент каф. Эмбриологии биологического факультета СПбГУ

12 сентября 2017

Технологии, связанные со стволовыми клетками развиваются бок
о бок
с прогрессом в фундаментальной науке



ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ

Регенерация – гомеостатический процесс, который, который поддерживает или восстанавливает первичную архитектуру и функцию ткани

Фиброз – процесс, при котором повреждённые ткани населяются фибробластами, которые не восстанавливают структуру ткани, а лишь замещают при помощи образования рубца.

Как «сделать» новый орган?

Трансплантация

Тканезамещение

Вытеснение процесса фиброза

Необходимость фундаментальных знаний из разных областей биологии

Исторически регенеративная биология началась с изучения процессов заживления ран различного происхождения

Пещеры палеолита –рисунки ладоней без пальцев

Методы помощи при заживлении ран были описаны у древних в Египте, Китае, Индии, инков

С каждым годом запрос на РМ растёт (старение, недоношенность, успехи в лечении многих заболеваний и т. д....)

Регенерационная медицина – это область науки, которая фокусируется на новых

Подходах к аутологичной репарации и/или замещению клеток, тканей и/или органов

Это область науки фокусируется на трёх категориях исследований:

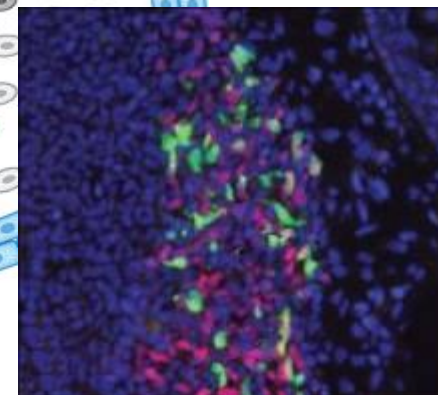
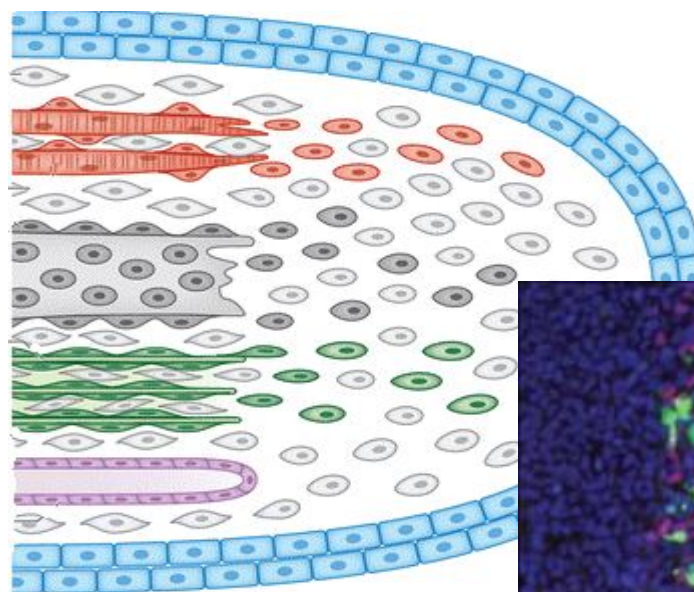
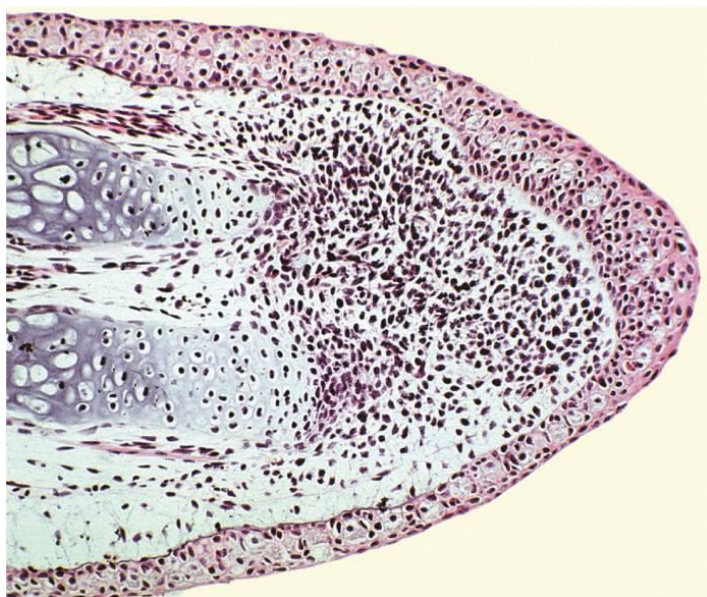
- клеточная терапия
- тканевая инженерия
- генная терапия

Понятие регенерации

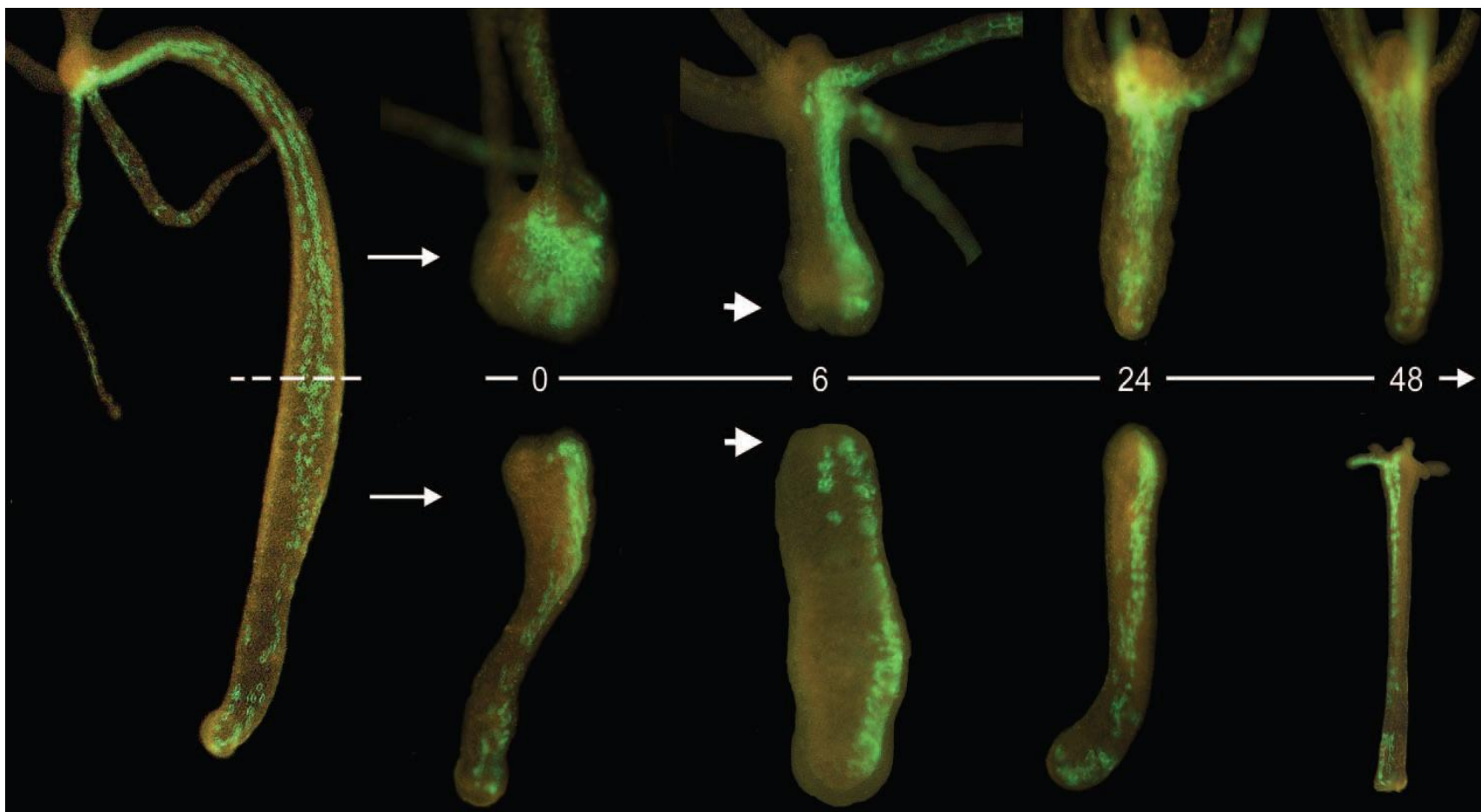
Восстановление взамен утраченного

Вторичное развитие, вызванное
повреждением

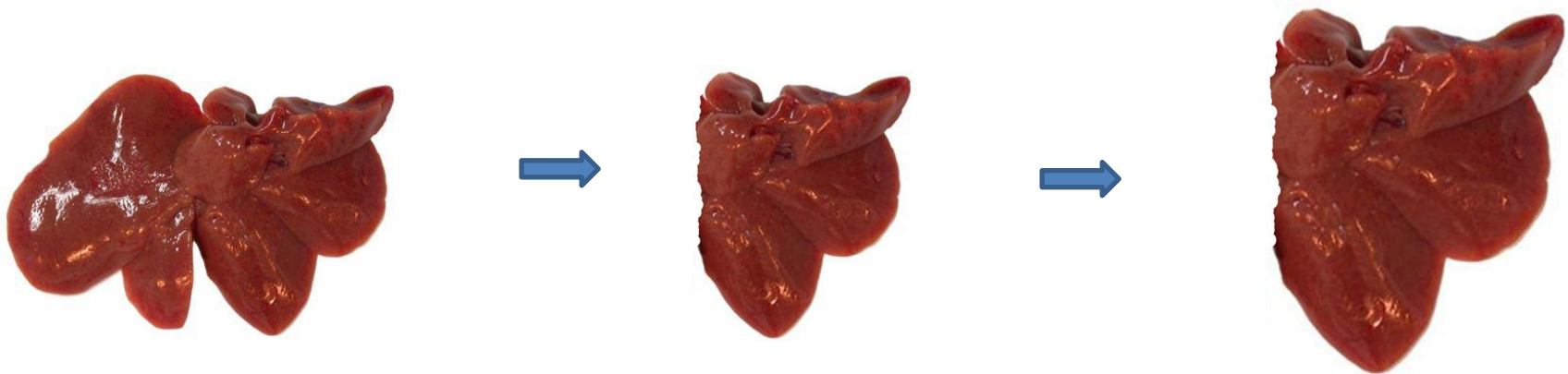
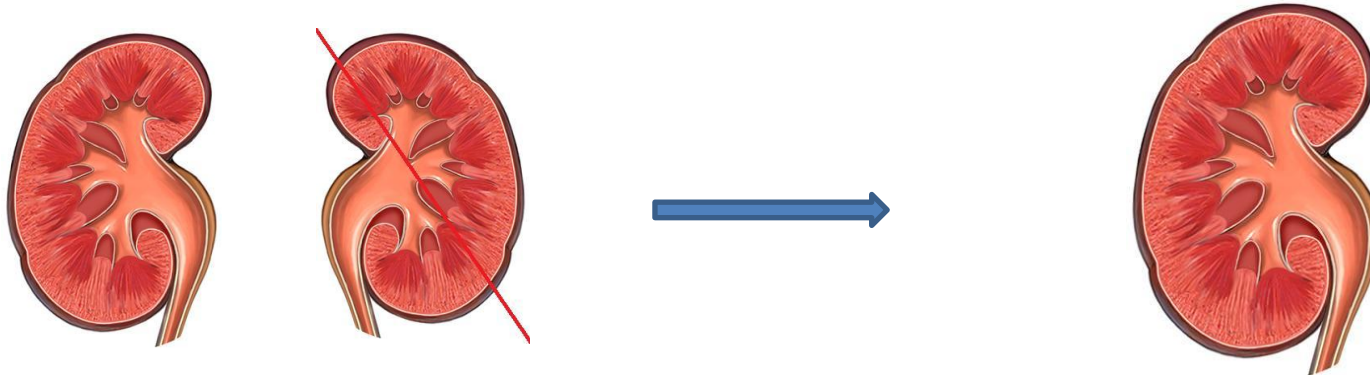
ЭПИМОРФОЗ



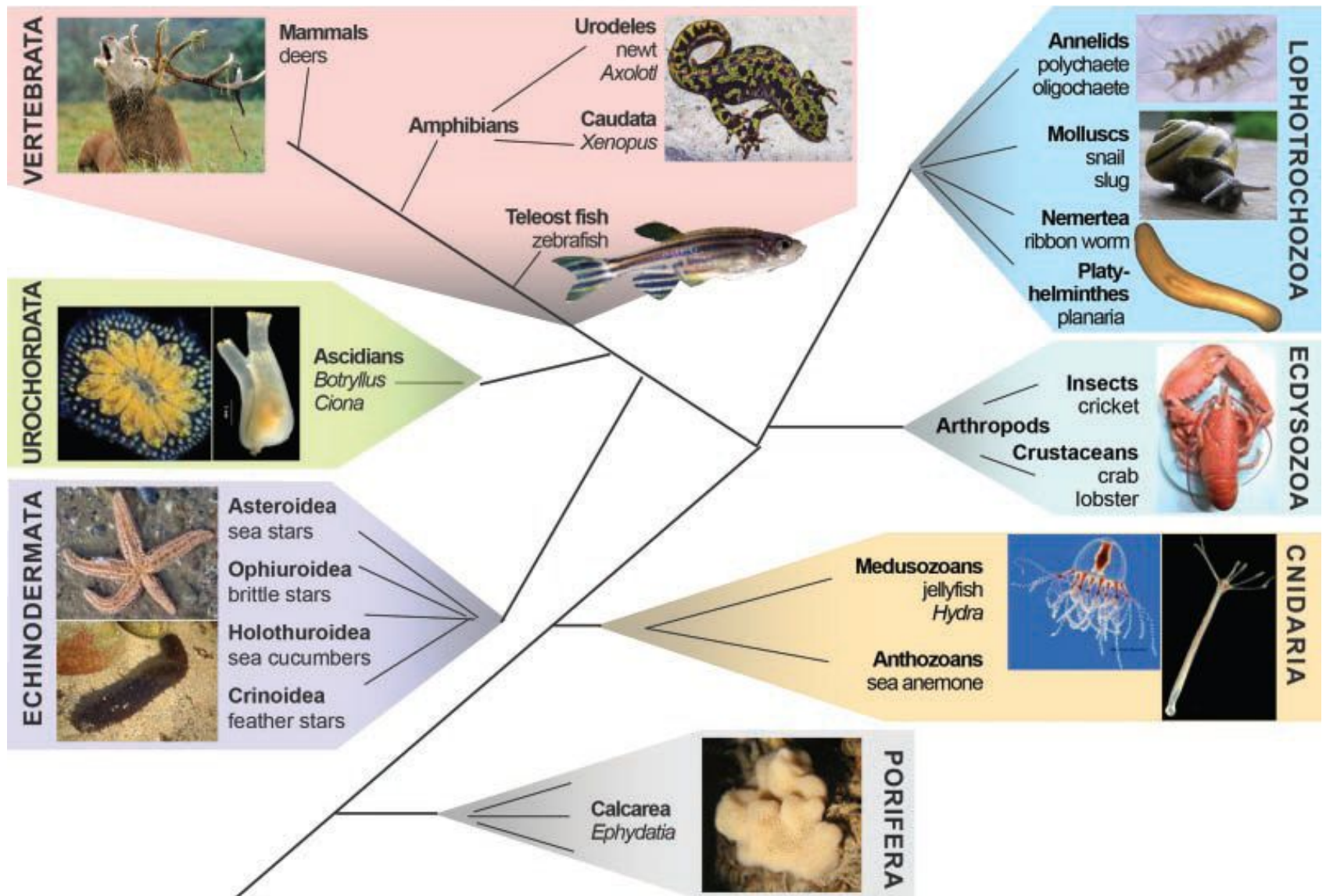
МОРФАЛЛАКСИС



РЕГЕНЕРАЦИОННАЯ ГИПЕРТРОФИЯ



ЭВОЛЮЦИЯ РЕГЕНЕРАЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ



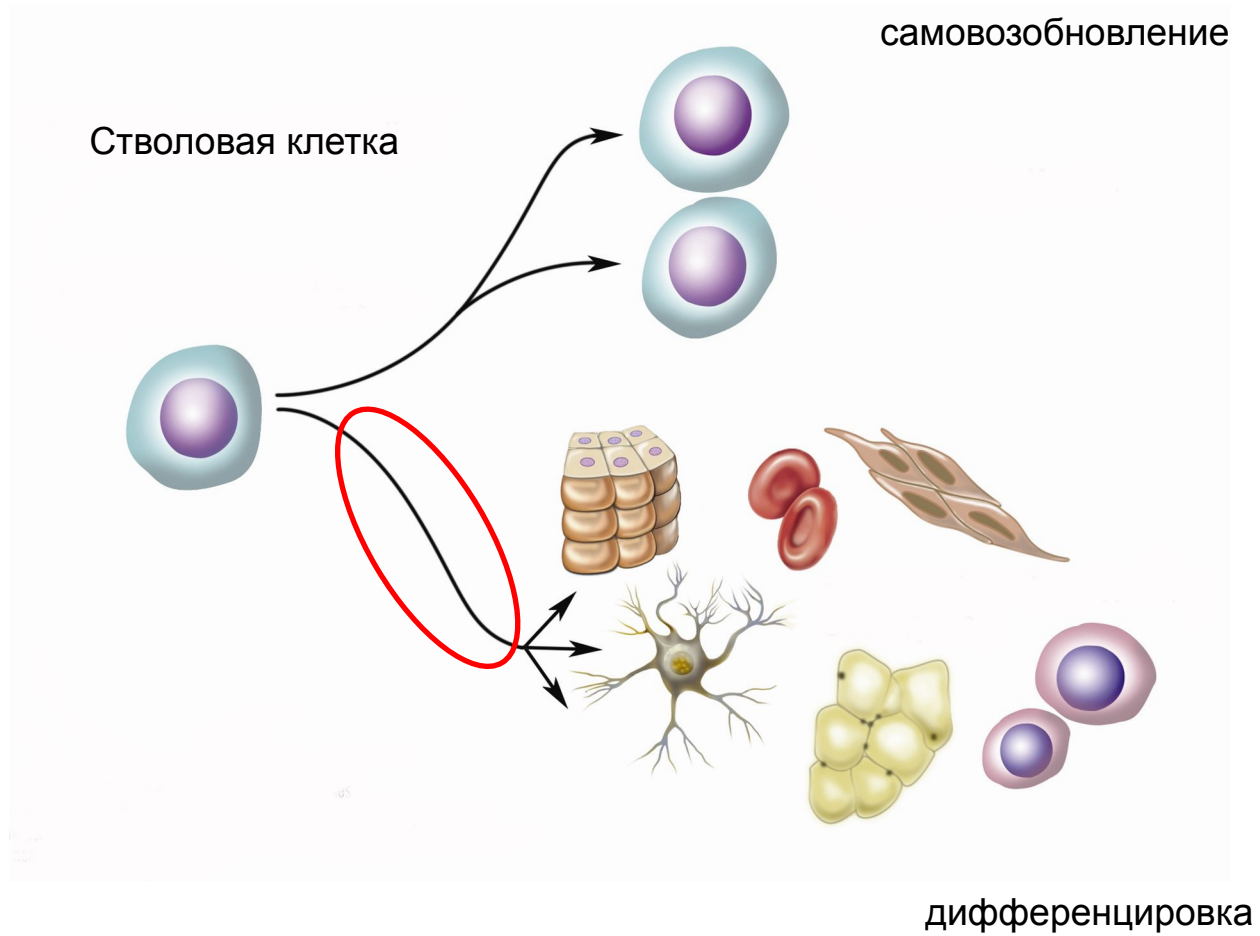
ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

1. Снижение масштаба регенерации
 - Не могут регенерировать конечности
 - Хорошо выражена регенерация клеток, тканей и некоторых органов
2. Паренхиматозные органы регенерируют по типу регенерационной гипертрофии
3. Репарация протекает с образованием рубца
4. У млекопитающих сохранены гены, которые регулируют регенерацию у низших позвоночных, однако эти гены активны только в пренатальном периоде

РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА

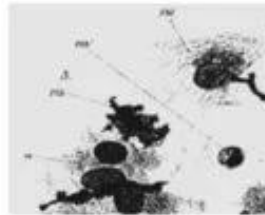
- Заставить работать гены, управляющие регенерацией у низших позвоночных
- Изменить воспалительную реакцию
- Доставить в место повреждения прогениторные (стволовые) клетки

Стволовые клетки – сочетание способности к самовозобновлению и дифференцировке



История открытия стволовых клеток

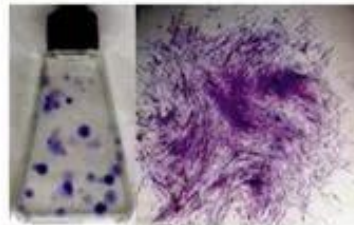
Стволовые клетки
открыты в 1909 году



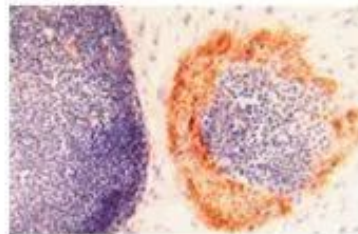
**1909 – гемопозитические
СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ**
*Maximow A.A. Folia
Haematologica. 1909. 8: 125—134.*



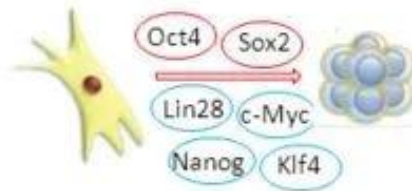
Александр
Александрович
Максимов
(1874 – 1928)



**1968 – мезенхимальные
СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ**
*Friedenstein A.J. et al.
Transplantation. 1968. 6 (2):
230–47.*



**1998 – эмбриональные
СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА**
*Thomson J.A. et al. Science.
1998. 282: 1145-1147.*



**2006 – индуцированные
плюрипотентные клетки**
*Takahashi K, Yamanaka S. Cell.
2006. 126(4):663-766.*

Med. X : 8
164

Folia Haematologica

I. (morphologischer) Teil des

Internationalen Zentralorgans für
Blut- und Serumforschung

in Gemeinschaft mit

V. Babes, Bucuresci; Banti, Firenze; von Baumgarten, Tübingen; Belfanti, Milano; Bettencourt, Lisboa; Bordet, Bruxelles; Browicz, Kraków; Calmette, Lille; Celli, Roma; Courmont, Lyon; Curschmann, Leipzig; Deckhuyzen, Utrecht; Dengs, Louvain; Eichhorst, Zürich; Ewing, New York; Ferran, Barcelona; Fob, Torino; Akira Fujinami, Ky-o-to; E. Grawitz, Berlin; Hamburger, Groningen; Hagem, Paris; M. Heidenhain, Tübingen; Hlava, Praha; v. Jaksch, Prag; Joest, Dresden; Klemensiewicz, Graz; A. v. Korányi, Budapest; F. Kraus, Berlin; Laache, Kristiania; Laveran, Paris; R. Lépine, Lyon; v. Leube, Würzburg; v. Leyden, Berlin; L. Loeb, Philadelphia; Löwit, Innsbruck; Maccallum, Baltimore; Malassez, Paris; Maragliano, Genova; Marchand, Leipzig; Marchiafava, Roma; Metschnikoff, Paris; Neusser, Wien; Nikiforoff, Moskwa; Nocht, Hamburg; Orth, Berlin; Pfeiffer, Breslau; Podwyszołkiy, St. Petersburg; Riva, Parma; Sawitschenko, St. Petersburg; Senator, Berlin; Sherrington, Liverpool; W. S. Thayer, Baltimore; Warthin, Ann Arbor; F. Widal, Paris; A. E. Wright, London;

herausgegeben und unter Mitwirkung von

Arneht, Münster; Hubertin, Paris; Bensaudé, Paris; R. Blumenthal, Bruxelles; Brugsch, Berlin; Bunting, Virginia; Cabot, Boston; Dominici, Paris; Goodall, Edinburgh; Galland, Edinburgh; Helly, Prag; Hirschfeld, Berlin; J. Jolly, Paris; St. Klein, Warszawa; Körmöczy, Budapest; Maximow, St. Petersburg; Erich Meger, Straßburg i. E.; Morawitz, Freiburg i. B.; O. Moritz, St. Petersburg; Opie, Baltimore; Parkes-Weber, London; Sabrazès, Bordeaux; O. Schauman, Helsingfors; Sgllaba, Praha; Türk, Wien; Vaquez, Paris; K. Ziegler, Breslau

und anderen hervorragenden Fachgelehrten des In- und Auslandes

geleitet von

ARTUR PAPPENHEIM

VIII. Band



Leipzig 1909

Verlag von Dr. Werner Klinkhardt

Paris, 2, rue Bonaparte, Frédéric Gittler
Librairie

New York, G. E. Stechert & Co.
129—133 West 20th Street

Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere.¹⁾

Von

Prof. Dr. **A. Maximow.**

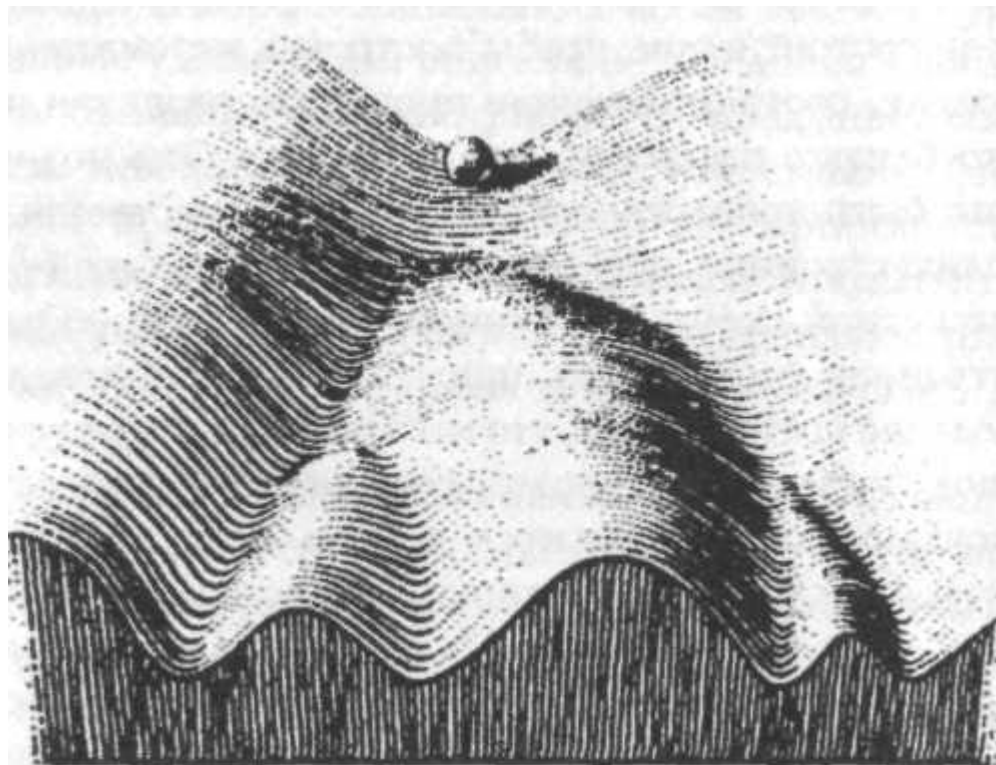
Die ersten Blutelemente entstehen bekanntlich aus den sog. Blutinseln, aus unregelmässig begrenzten, miteinander netzartig verbundenen Zellansammlungen des peripheren mesenchymatösen Mesoblasts, im Bereiche der Area opaca. Die peripherischen Zellen der Blutinseln platten sich ab, werden zu Endothelzellen, die inneren runden sich ab und schwimmen als die ersten Blutzellen frei in einer Flüssigkeit, die man Blutplasma nennen kann. Ich habe nun gefunden, dass diese primitiven Blutzellen, wie ich sie nenne, keineswegs Erythroblasten vorstellen, wie es nach der geläufigen Vorstellung sein sollte, sondern vollkommen indifferente Elemente, mit rundem hellem Kern und schmalem basophilem Protoplasma; es sind weder rote, noch weisse Blutkörperchen; eher dürften sie noch weisse Blutkörperchen genannt werden, da sie manchmal, besonders z. B. beim Hühnchen, sofort amöboid und den grossen Lymphozyten sehr ähnlich sind. Sie wuchern weiter, in der ersten Zeit vergrössert sich ihre Zahl auch noch durch Ablösung der Endothelzellen in den primitiven Gefässen.

Nach einiger Zeit bemerkt man dann, wie sich diese primitiven Blutzellen in zwei Zellarten spalten. Die einen, die meisten, arbeiten im Protoplasma Hämoglobin aus und werden dadurch zu den sog. primitiven Erythroblasten. Es sind grosse, wuchernde, zuletzt sehr hämoglobinreiche Zellen mit relativ kleinen Kernen. Sie dienen dem Organismus lange Zeit, sterben aber allmählich aus und werden von den definitiven Erythroblasten und Erythrozyten verdrängt.

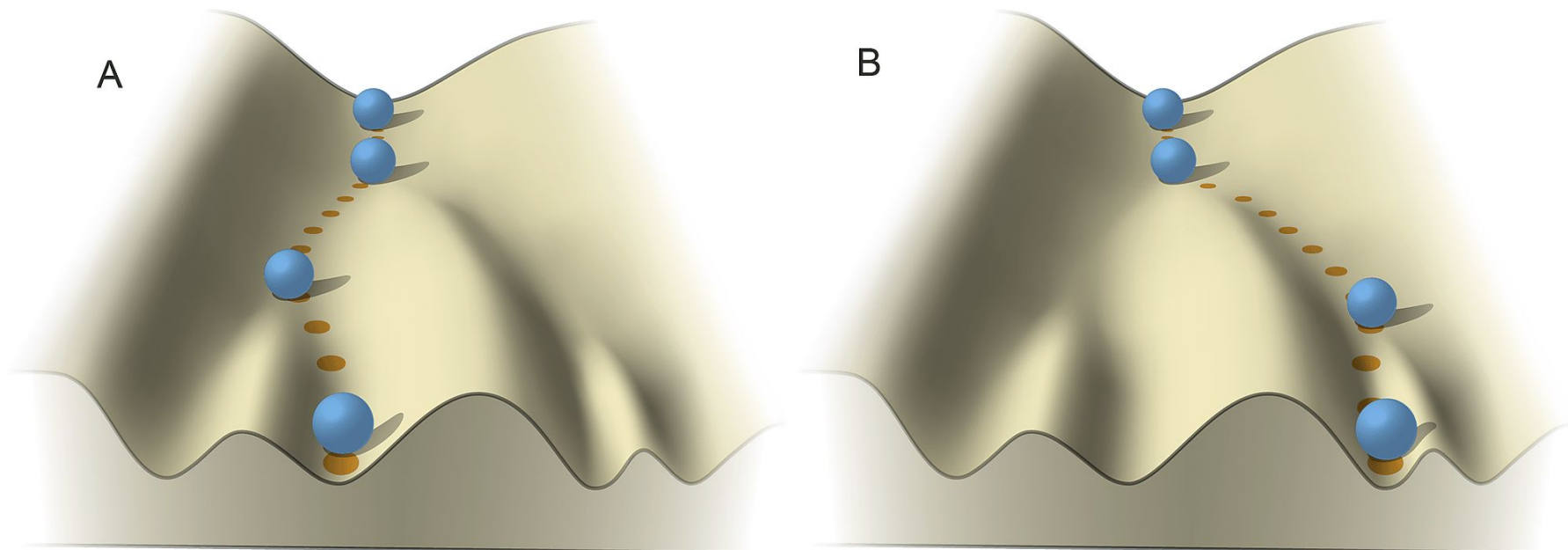
Der andere Teil der primitiven Blutzellen bleibt hämoglobinos — es sind jetzt Zellen mit grossem hellem nukleolenhaltigem Kern, schmalem, amöboidem, stark basophilem Plasmasaum; histologisch entsprechen sie vollkommen dem Begriff der grossen Lymphozyten. Es sind die ersten Leukozyten des Embryo, die also als Lymphozyten erscheinen.

¹⁾ Demonstrationsvortrag, gehalten in der ausserordentlichen Sitzung der Berliner Hämatologischen Gesellschaft am 1. Juni 1909.

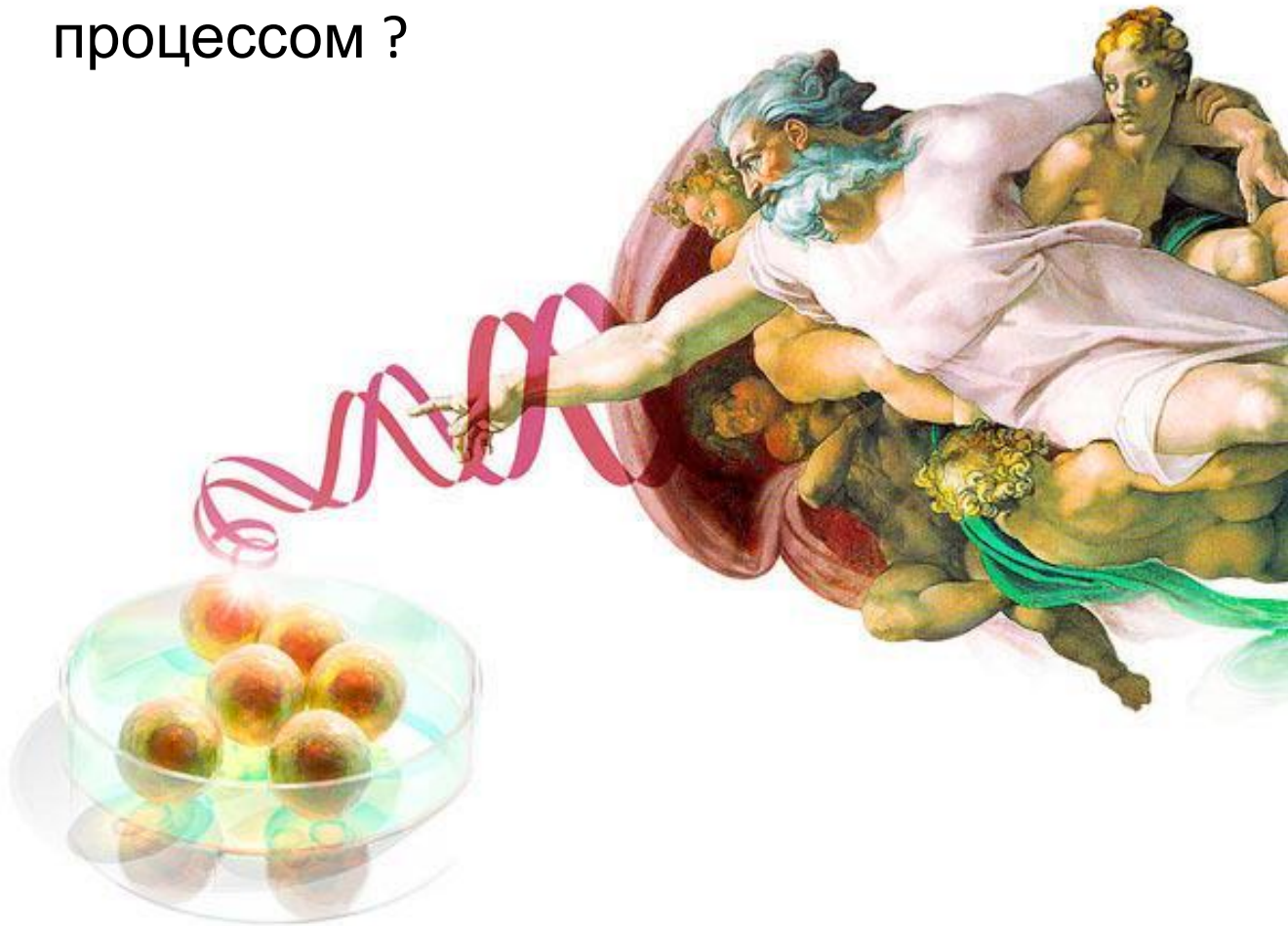
Конрад Уоддингтон и морфогенетические поля, 1942 г



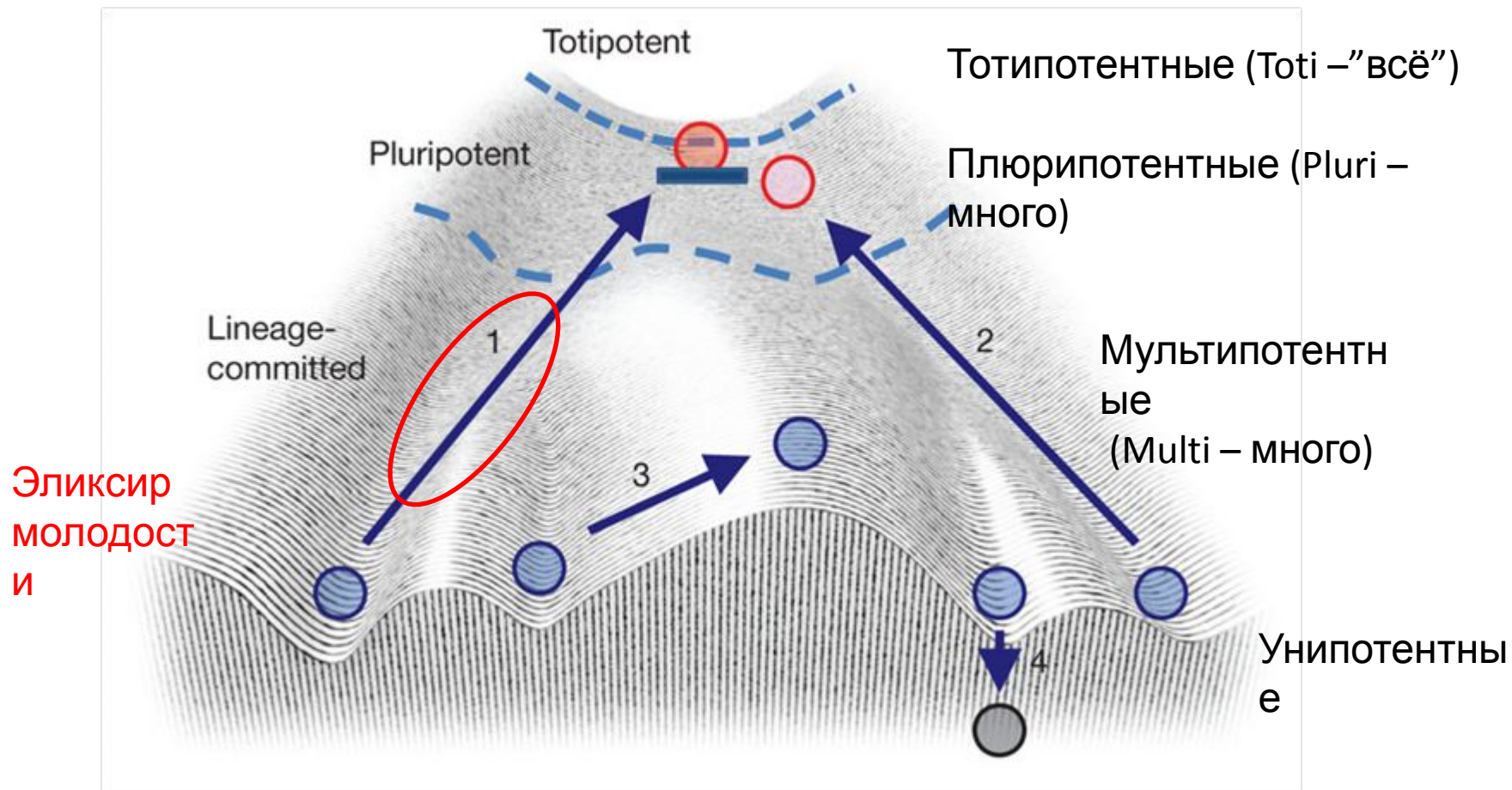
Одна и та же клетка потенциально может прожить разную жизнь



Кто решает, в какую клетка разовьется
данная
и как мы можем управлять этим
процессом ?



Потентность (стволовость) стволовых клеток



Классификация стволовых клеток

плюрипотентны

е

тканеспецифичн
ые

индуцированные
Плюрипотнтные
Induced pluripotent stem cells
iPSC

Эмбриональные
стволовые
Embryonic stem cells

Эмбриональные стволовые клетки

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2007



Photo: U. Montan
Mario R. Capecchi
Prize share: 1/3



Photo: U. Montan
Sir Martin J. Evans
Prize share: 1/3



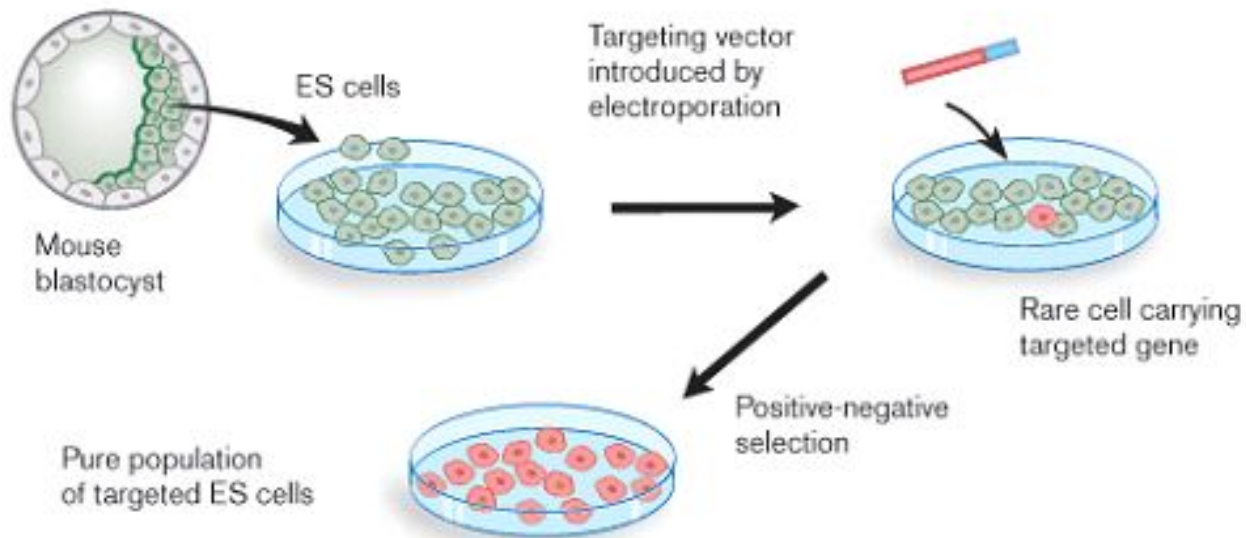
Photo: U. Montan
Oliver Smithies
Prize share: 1/3

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2007 was awarded jointly to Mario R. Capecchi, Sir Martin J. Evans and Oliver Smithies *"for their discoveries of principles for introducing specific gene modifications in mice by the use of embryonic stem cells"*.

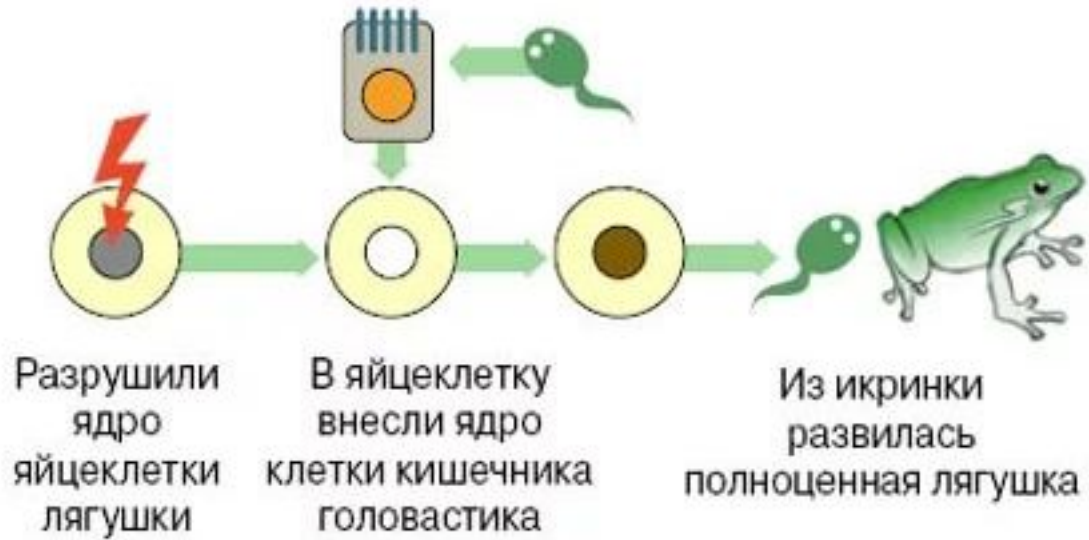
Эмбриональные стволовые клетки



A. Gene targeting of embryonic stem cells

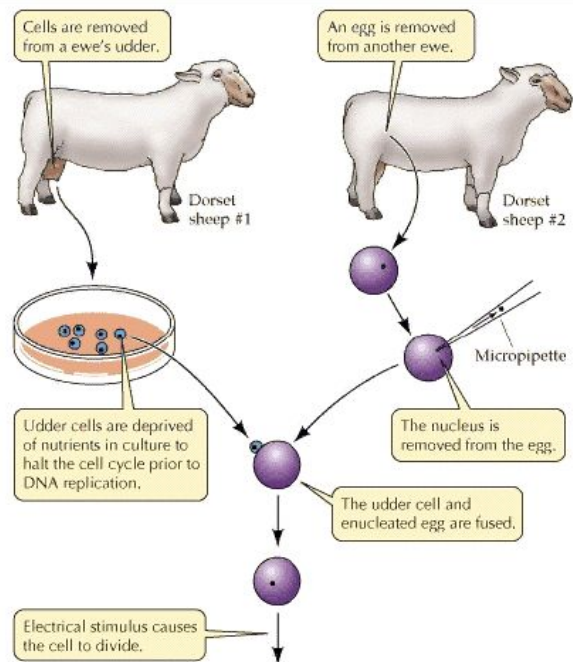


Эксперименты Джона Гердона по репрограммированию, 1962

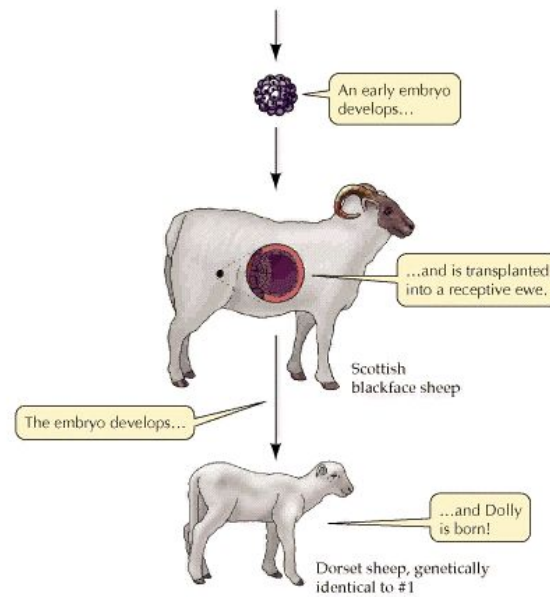


Ян Вильмут и овечка
Долли





Клонирование Долли (1997) показало принципиальную возможность репрограммирования



Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012



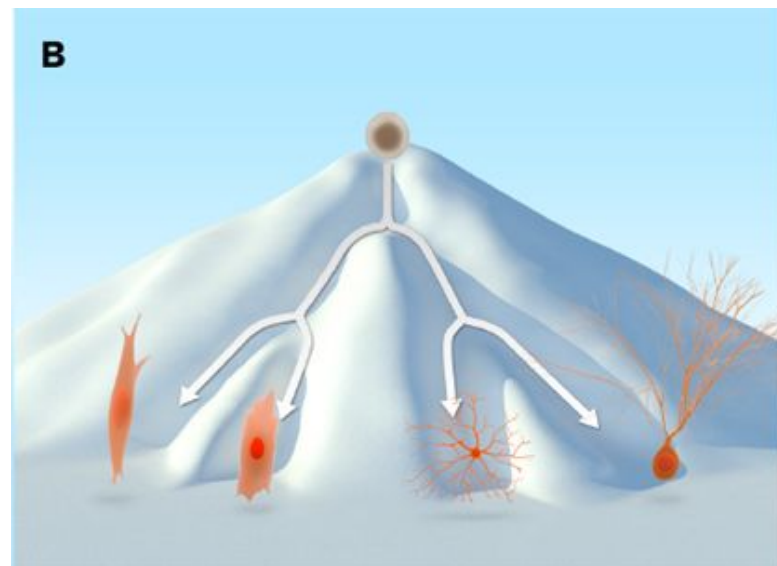
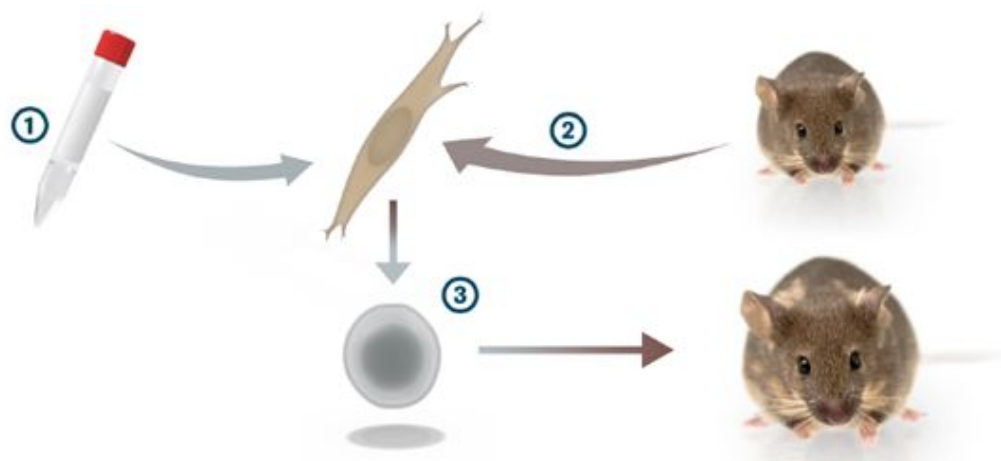
Photo: U. Montan
Sir John B. Gurdon
Prize share: 1/2



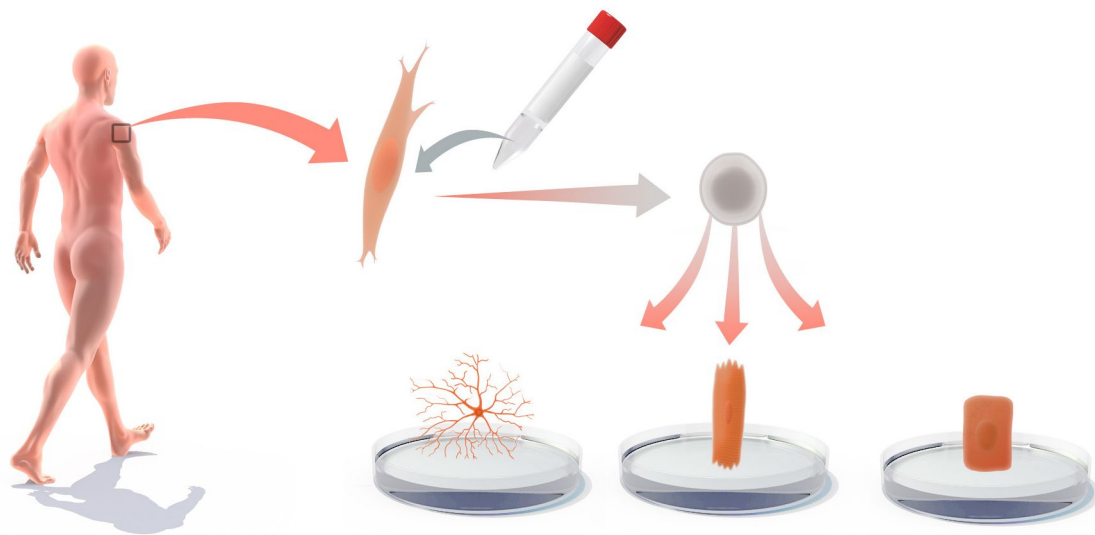
Photo: U. Montan
Shinya Yamanaka
Prize share: 1/2

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012 was awarded jointly to Sir John B. Gurdon and Shinya Yamanaka *"for the discovery that mature cells can be reprogrammed to become pluripotent"*

Введение 4 генов способно репрограммировать любой тип клеток!



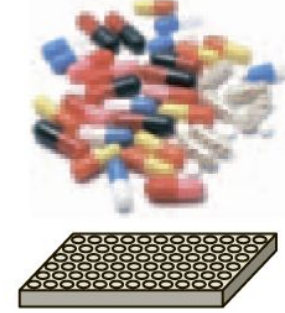
Технология плюрипотентных стволовых клеток позволяет потенциально получить из любой клетки взрослого организма стволовые клетки, способные дифференцироваться в любом направлении



Схематическое представление потенциала технологии иПК в регенеративной медицине

- воспроизведение специфического для заболевания фенотипа;
 - масштабируемость анализа
 - для скрининга лекарств;
- эффективность *in vivo*
- токсичность

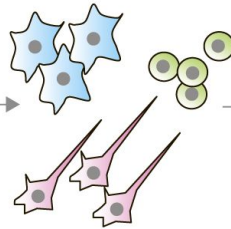
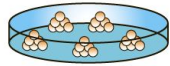
Поиск лекарств («моделирование» заболевания)



Лечение многих пациентов



Лечение одного пациента



пациент

иПК, специфичные для конкретного пациента

Специализированные клетки

Клеточная терапия

-детекция иПК высокого качества

-доступность эффективных протоколов дифференцировки;

-доклинические испытания на адекватных животных моделях

-успешное приживление;

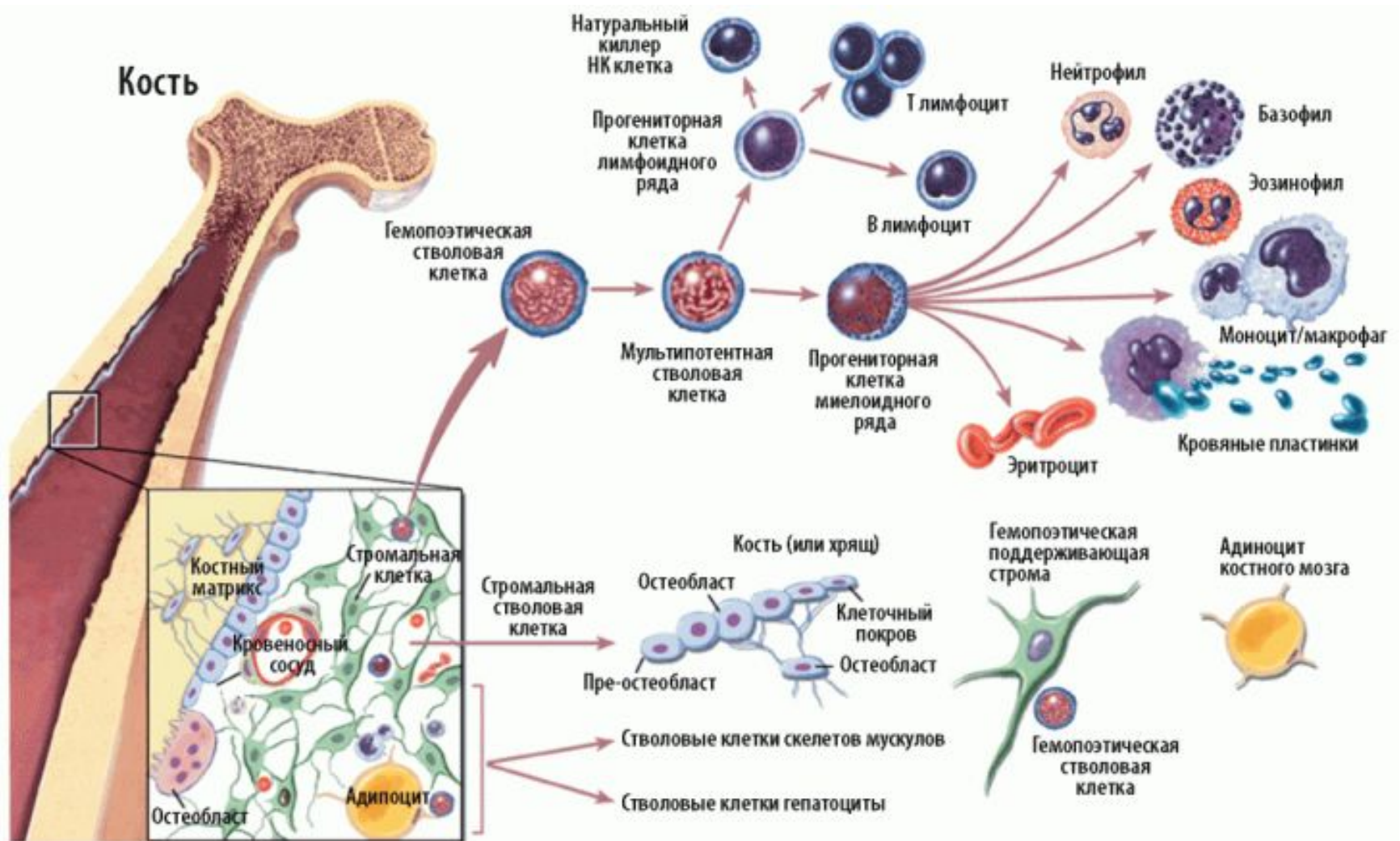
-риск тератом

-уровень зрелости и функциональности клеток

-эффективность *in vivo*;

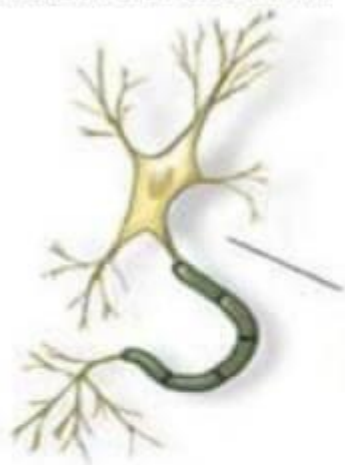
-стоимость индивидуальной (patient specific) терапии

ГЕМОПОЭТИЧЕСКИЕ КЛЕТОЧНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ

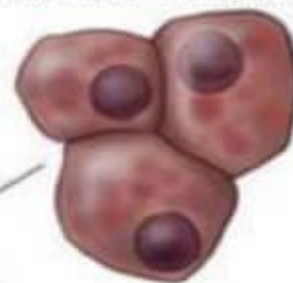


НЕРВНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

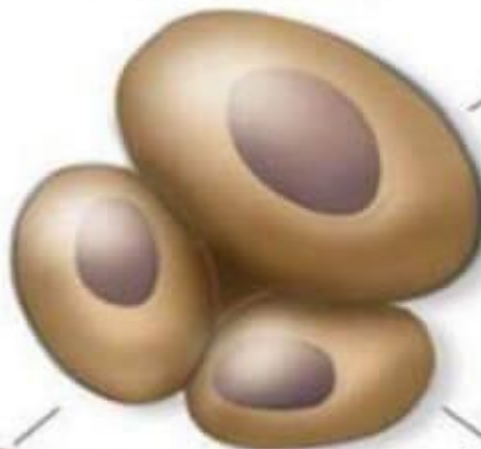
НЕРВНЫЕ КЛЕТКИ



КЛЕТКИ ПЕЧЕНИ



СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ



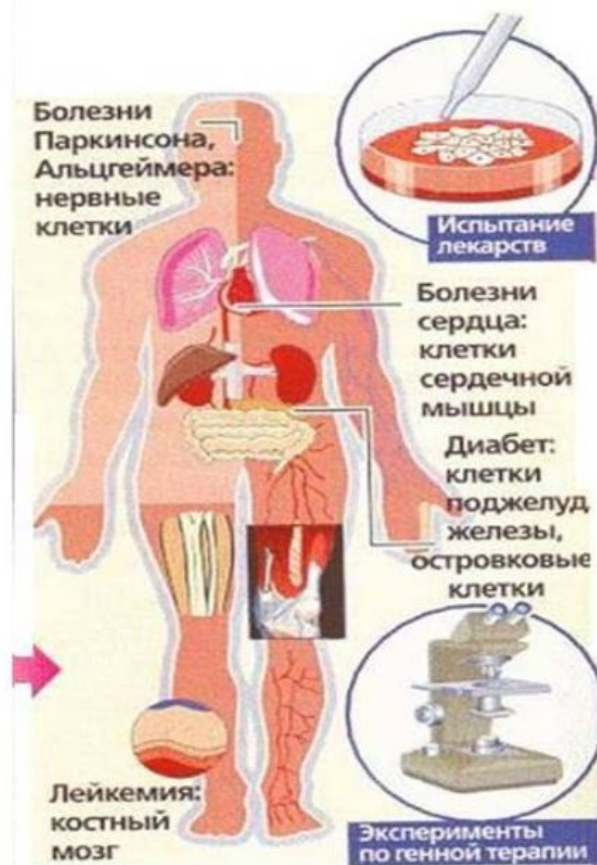
КЛЕТКИ СЕРДЦА



КЛЕТКИ КРОВИ

Использование стволовых клеток

- неврология (лечение последствий травм головного и спинного мозга, инсульта, коматозных состояний, нейродегенеративные заболевания и др.);
- кардиология (лечение атеросклероза, ИБС и последствий инфаркта миокарда);
- эндокринология (лечение инсулинозависимого диабета, последствий овариэктомии и др.);
- болезни опорно-двигательного аппарата (репарация костей, костная пластика, лечение миопатий, последствий травмы, рубцово-спаечных процессов);
- гепатология (лечение гепатитов, цирроза печени);
- гематология;
- косметология;
- геронтология и гериатрия



Постнатальные стволовые клетки

Стволовые клетки зрелого организма обладают меньшей потентностью в сравнении с эмбриональными и фетальными стволовыми клетками, то есть могут порождать меньшее количество различных типов клеток. Возможность использования аутогенного материала обеспечивает эффективность и безопасность лечения.

Стволовые клетки взрослого организма можно подразделить на три основных группы:

- 1)гемопозитические (кроветворные),
- 2)мультипотентные мезенхимальные (стромальные) и
- 3)тканеспецифичные прогениторные клетки.

Иногда в отдельную группу выделяют клетки пуповинной крови, поскольку они являются наименее дифференцированными из всех клеток зрелого организма, то есть обладают наибольшей потентностью. Пуповинная кровь в основном содержит гемопозитические стволовые клетки, а также мультипотентные мезенхимальные, но в ней присутствуют малые количества других разновидностей стволовых клеток, при определённых условиях способные дифференцироваться в клетки различных органов и тканей.

Гемопоэтические стволовые клетки

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) — мультипотентные стволовые клетки, дающие начало всем клеткам крови миелоидного (моноциты, макрофаги, нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, эритроциты, мегакариоциты и тромбоциты, дендритные клетки) и лимфоидного рядов (Т-лимфоциты, В-лимфоциты и естественные киллеры). Гемопоэтическая ткань содержит клетки с долгосрочными и краткосрочными возможностями к регенерации, включая мультипотентные, олигопотентные и клетки-предшественники. Миелоидная ткань содержит одну ГСК на 10 000 клеток. ГСК являются неоднородной популяцией. Различают три субпопуляции ГСК, в соответствии с пропорциональным отношением лимфоидного потомства к миелоидному (Л/М):

- 1) миелоидно ориентированные ГСК
- 2) лимфоидно ориентированные ГСК
- 3) «сбалансированных» ГСК

Популяция ГСК формируется во время эмбриогенеза. До формирования костного мозга популяция расширяется в фетальной печени.

Основным источником ГСК является костный мозг (в бедренных костях, рёбрах, грудице). Этот источник наиболее широко используется в трансплантологии.

Вторым, наиболее важным и перспективным источником ГСК является пуповинная кровь. Концентрация ГСК в пуповинной крови в десять раз выше, чем в костном мозге. Кроме того, у этого источника есть ряд преимуществ. Важнейшие из них:

Возраст- пуповинная кровь собирается на самом раннем этапе жизни организма. ГСК пуповинной крови максимально активны, поскольку не подвергались негативному воздействию внешней среды (инфекционные заболевания, нездоровое питание и т. д.). ГСК пуповинной крови способны создать большую клеточную популяцию в короткий срок. Совместимость. Использование аутологичного материала, то есть собственной пуповинной крови гарантирует 100%-ную совместимость.

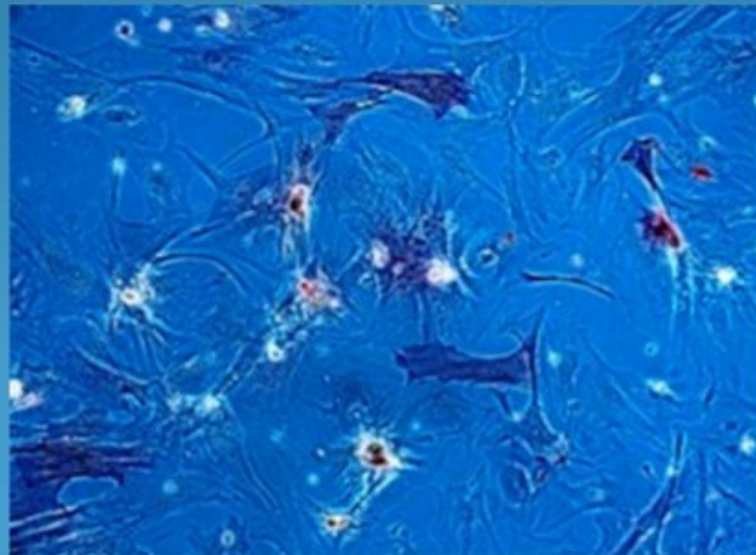
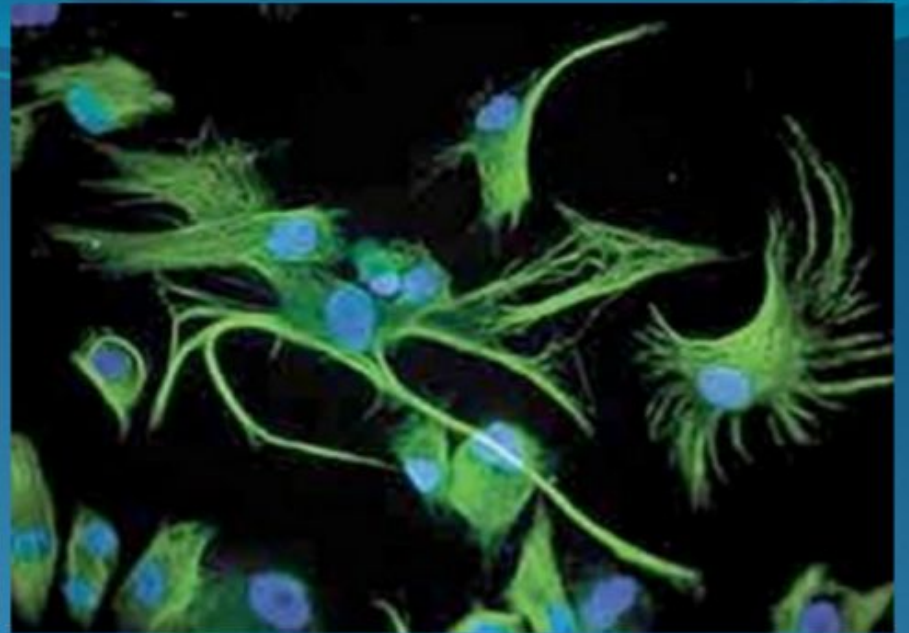
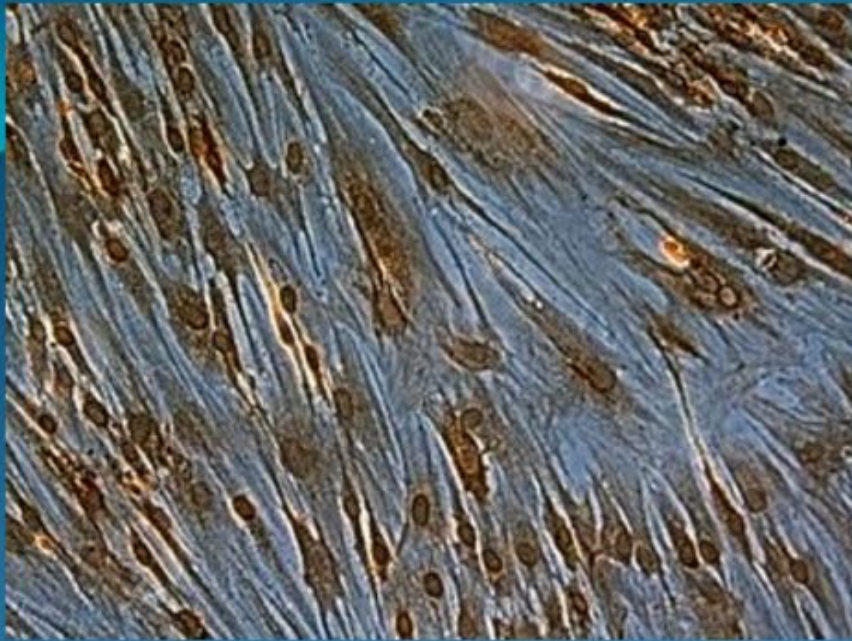
Совместимость с братьями и сёстрами составляет до 25 %, как правило, возможно также использование пуповинной крови ребёнка для лечения других близких родственников. Для сравнения, вероятность нахождения подходящего донора стволовых клеток — от 1:1000 до 1:1000 000.

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) — мультипотентные стволовые клетки, способные дифференцироваться в остеобласты (клетки костной ткани), хондроциты (хрящевые клетки) и адипоциты (жировые клетки).

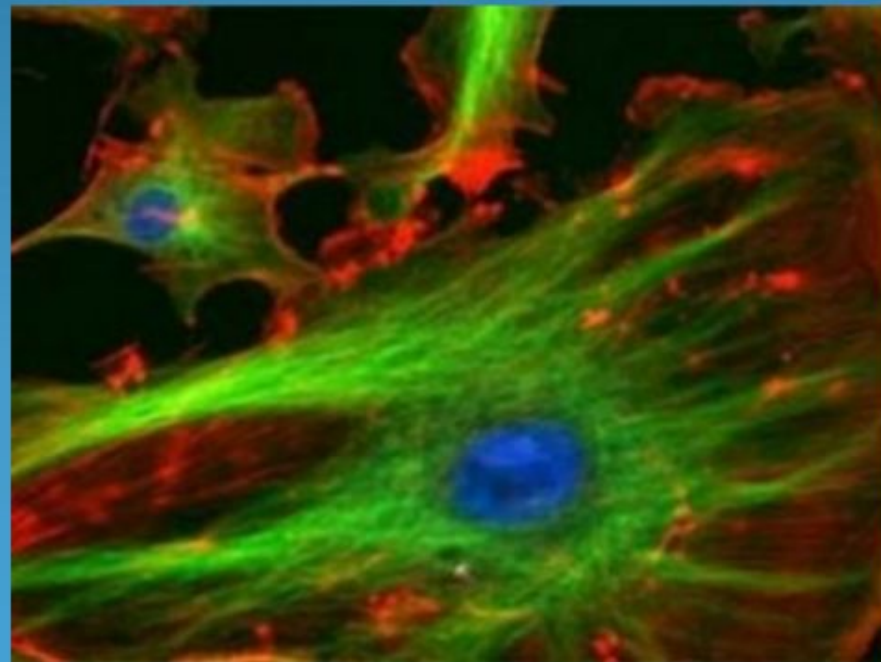
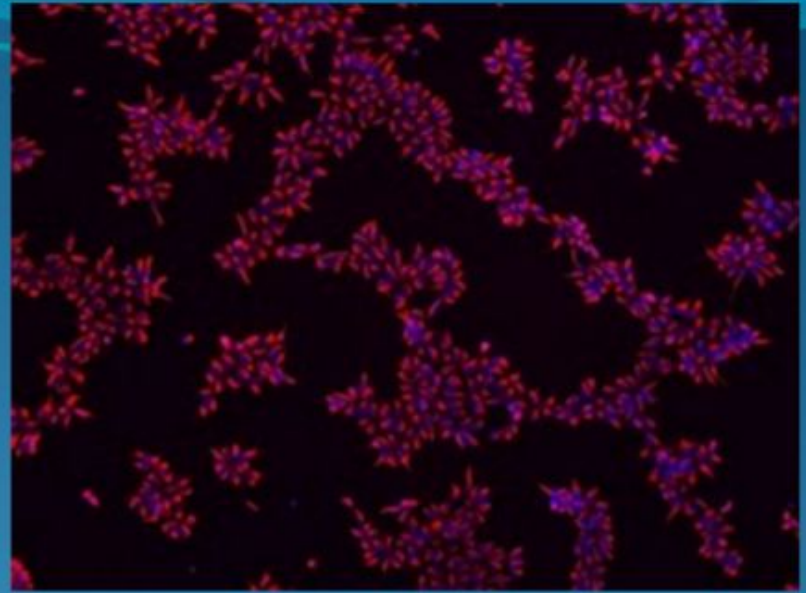
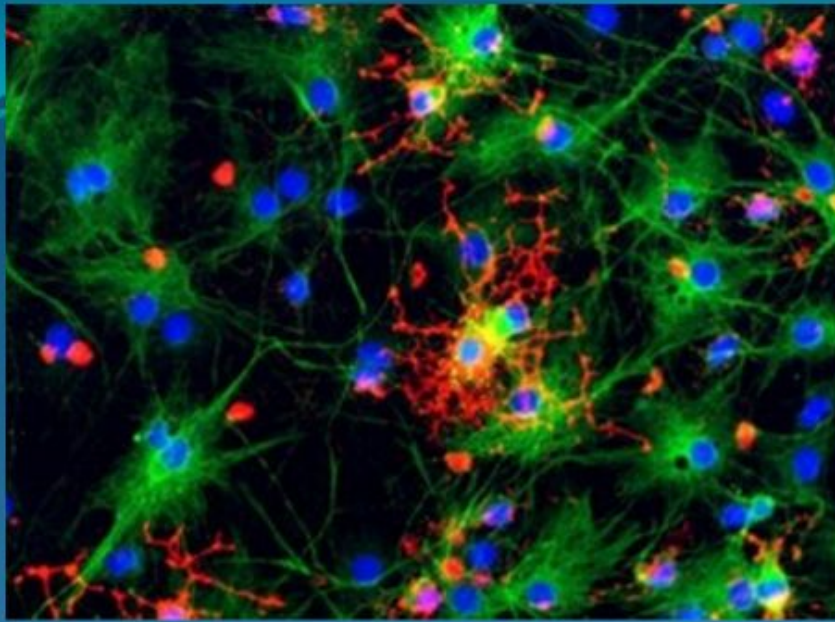
Предшественниками ММСК в эмбриогенный период развития являются мезенхимальные стволовые клетки (МСК). Они могут быть обнаружены в местах распространения мезенхимы, то есть зародышевой соединительной ткани.

Основным источником ММСК является костный мозг. Кроме того, они обнаружены в жировой ткани и ряде других тканей с хорошим кровоснабжением. Существует ряд доказательств того, что естественная тканевая ниша ММСК расположена вокруг кровеносных сосудов. Кроме того, ММСК были обнаружены в пульпе молочных зубов, амниотической жидкости, пуповинной крови и вартоновом студне. Важнейшей и наиболее перспективной областью клинического применения ММСК является которансплантация совместно с ГСК в целях улучшения приживления образца костного мозга или стволовых клеток пуповинной крови. Многочисленные исследования показали, что ММСК человека могут избегать отторжения при трансплантации.



Тканеспецифичные прогениторные клетки

Тканеспецифичные прогениторные клетки (клетки-предшественницы) — малодифференцированные клетки, которые располагаются в различных тканях и органах и отвечают за обновление их клеточной популяции, то есть замещают погибшие клетки. К ним, например, относятся миосателлитоциты (предшественники мышечных волокон), клетки-предшественницы лимфо- и миелопоэза. Эти клетки являются олиго- и унипотентными и их главное отличие от других стволовых клеток в том, что клетки-предшественницы могут делиться лишь определённое количество раз, в то время как другие стволовые клетки способны к неограниченному самообновлению. Поэтому их принадлежность к истинно стволовым клеткам подвергается сомнению. Отдельно исследуются нейральные стволовые клетки, которые также относятся к группе тканеспецифичных. Они дифференцируются в процессе развития эмбриона и в плодный период, в результате чего происходит формирование всех нервных структур будущего взрослого организма, включая центральную и периферическую нервную системы. Эти клетки были обнаружены и в ЦНС взрослого организма, в частности, в гиппокампе, обонятельном мозге и т. д. Несмотря на то, что большая часть погибших нейронов не замещается, процесс нейрогенеза во взрослой ЦНС всё-таки возможен за счёт нейральных стволовых клеток, то есть популяция нейронов может «восстанавливаться», однако это происходит в таком объёме, что не сказывается существенно на исходах патологических процессов.



Содержание



СОСТАВ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК



Другие типы стволовых клеток локализуются в сформировавшихся тканях взрослого организма (*adult stem cells*). Они варьируют по способности к дифференцировке **от мультипотентных до унипотентных**. Фриденштейн А.Я. и его сотрудники впервые показали, что **в костном мозге помимо гемопоэтических имеются стромальные стволовые клетки**, которые при культивировании формировали колонии фибробластоподобных клеток.

У новорожденного в костном мозге на 10 тыс. стволовых кроветворных клеток – одна стромальная клетка.

У подростков стромальных клеток уже в 10 раз меньше, и с возрастом их количество продолжает уменьшаться – в 70 лет остается 1 стволовая клетка на миллион!..

ПУТИ ПРЕВРАЩЕНИЯ СТРОМАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК

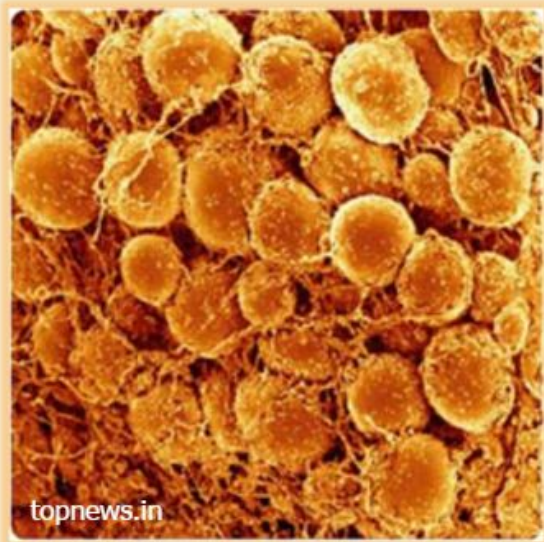


Стромальные стволовые клетки

Это проверенный природой **собственный восстановительный резерв организма** .

Преимущества использования

- Нулевой риск иммунного отторжения собственных стромальных клеток.
- Минимальная возможность их злокачественного перерождения.
- Безупречно с морально-этической точки зрения.
- Принципиально возможно вырастить большое количество стромальных клеток, а затем с помощью специальных сигнальных веществ направить их для восстановления поврежденных тканей.



В терапевтическом применении стромальных клеток сегодня, без сомнения, лидирует ортопедия. Для ожоговых больных используются дермальные эквиваленты кожи (искусственно выращенная кожа из клеток кожи пациента).

Стромальные клетки можно получать из клеток жировой ткани (адипоцитов) – они сравнительно легко проходят процесс дедифференцировки.

Адипоциты

Использование в медицине

Перспективы применения клеточных технологий во многих областях медицины, включая трансплантацию органов, испытание лекарственных препаратов, лечение и восстановление поврежденных тканей и т.д., очень заманчивы и близки, но до начала полного использования потенциала клеточных технологий необходимо разрешить проблемы:

- стволовые клетки должны быть доступны в достаточных количествах;
- дифференциация стволовых клеток должна быть строго направленной и специфичной;
- стволовые клетки должны быть жизнеспособны в организме реципиента;
- после трансплантации стволовые клетки должны быть способны интегрироваться в ткани реципиента;
- трансплантант должен функционировать в течение всей жизни реципиента;
- трансплантация не должна наносить какого-либо вреда реципиенту (включая иммунную реакцию отторжения).

Опасности, связанные с использованием стволовых клеток

1. Клинический опыт применения стволовых клеток чрезвычайно мал.
2. Отдаленные последствия лечения стволовыми клетками неизвестны.
3. В некоторых случаях существует риск онкогенного перерождения стволовых клеток;
4. Есть опасность инфицирования при терапии стволовыми клетками, т.к. часто неизвестно, где, как и из чего были получены эти стволовые клетки и тестировались ли они на инфекционную безопасность.

В Российской Федерации терапевтическое применение эмбриональных клеток станет возможным после принятия закона «О применении биомедицинских технологий в медицинской практике», который планирует рассмотреть Госдума РФ.

