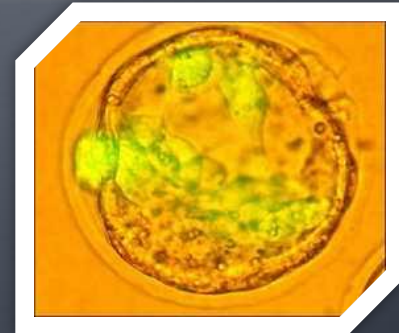
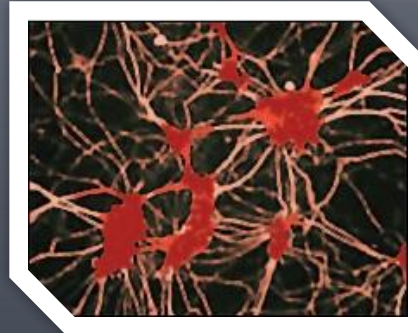
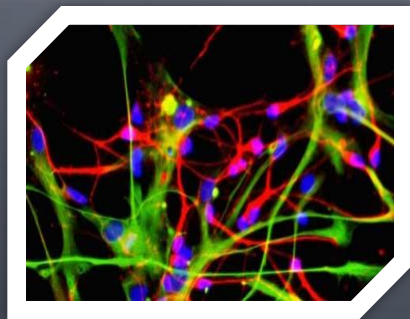
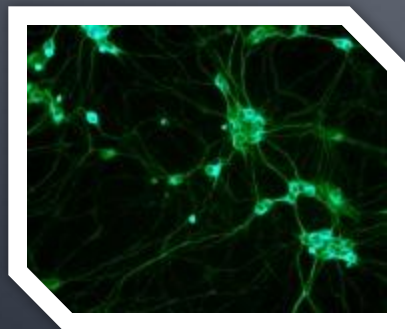


СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ



Современное представление

- О стволовых клетках много говорят
- На стволовые клетки надеются
- Стволовые клетки спасают жизни
- Стволовые клетки необходимо изучать

Где граница между вымыслом и реальностью?

Зачем они нужны?

Basic research – определение механизмов/ цепочек событий происходящих при развитии человека. Понимание молекулярных основ развития онкологических заболеваний.

- Молекулярные механизмы контроля генов
- Роль сигналов в экспрессии генов в стволовых клетках и дифференцировке
- Теория раковых стволовых клеток
- Регенерация тканей

Зачем они нужны?

Доклинические исследования – стволовые клетки могут позволить создать новые модели для тестирования лекарств

1. Безопасное тестирование новых лекарств на дифференцированных клетках
2. Скрининг потенциальных лекарств:
 - Раковые клеточные линии уже были использованы для поиска противоопухолевых лекарственных препаратов.
 - Возможности ЭСК могут позволить проводить тестирование лекарств сразу на широком спектре типов клеток и минимизировать тесты на животных

Зачем они нужны?

Клеточная терапия:

- Регенеративная терапия таких заболеваний как: болезни Паркинсона, Альцгеймера, Боковой амиотрофический склероз, травма спинного мозга, инсульт, инфаркт, ожоги, остеоартриты, ревматоидный артрит и т.д.
- Стволовые клетки и генная терапия
 - Стволовые клетки могут быть носителями ген. конструкций или могут быть сами изменены
- Стволовые клетки и рак

Практика

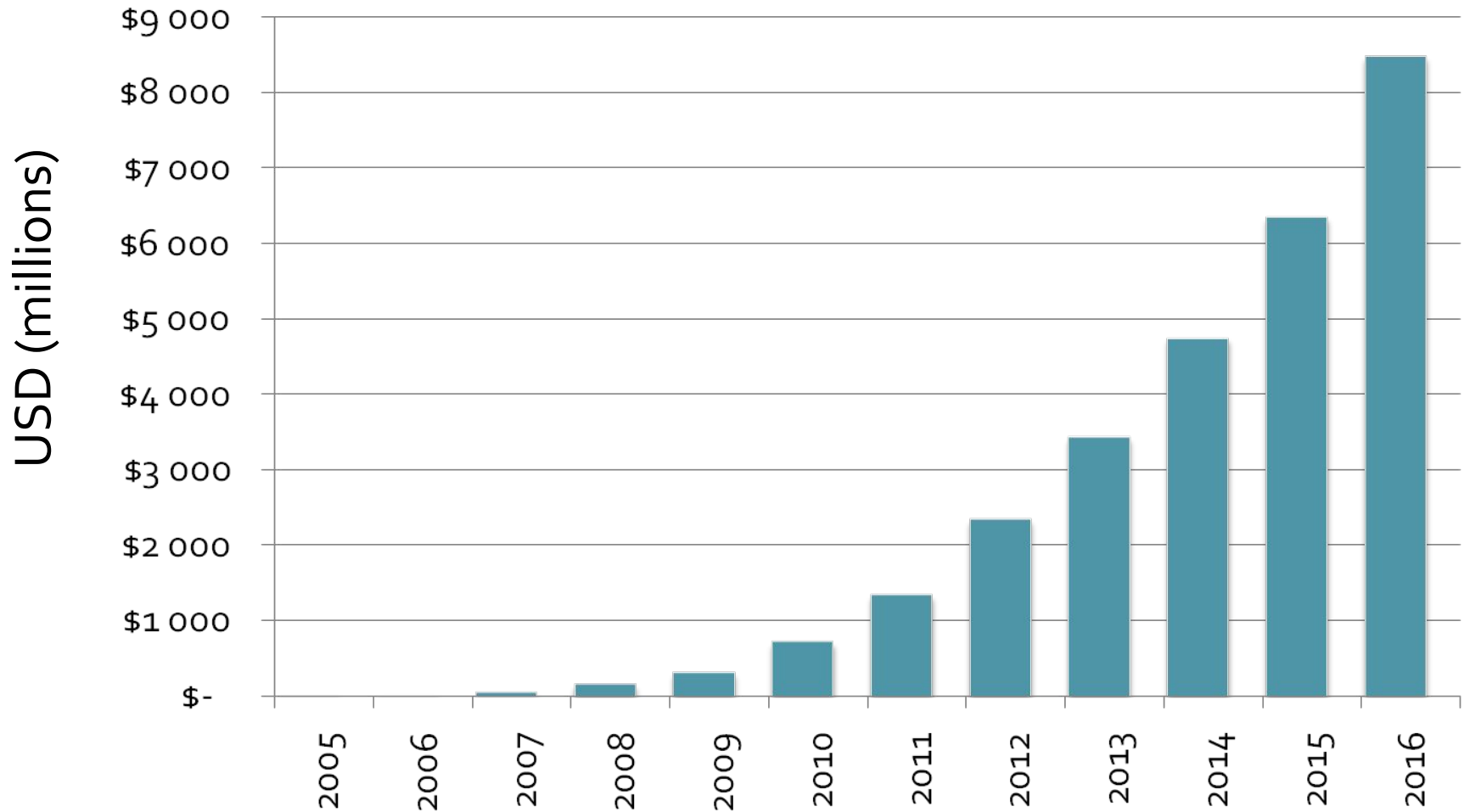
Research/Disease Areas (Dollars in millions and rounded)	FY 2013Actual	FY 2014Actual	FY 2015Actual	FY 2016Actual	FY 2017Estimated (Enacted)	FY 2018Estimated
Stem Cell Research	\$1,273	\$1,391	\$1,429	\$1,516	\$1,582	\$1,230
Stem Cell Research - Embryonic - Human	\$146	\$166	\$180	\$206	\$213	\$167
Stem Cell Research - Embryonic - Non-Human	\$154	\$150	\$159	\$146	\$152	\$117
Stem Cell Research - Induced Pluripotent Stem Cell	\$228	\$313	\$324	\$374	\$387	\$300
Stem Cell Research - Induced Pluripotent Stem Cell - Human	\$199	\$280	\$282	\$335	\$347	\$269
Stem Cell Research - Induced Pluripotent Stem Cell - Non-Human	\$43	\$49	\$61	\$56	\$58	\$45
Stem Cell Research - Nonembryonic - Human	\$431	\$443	\$445	\$457	\$480	\$373
Stem Cell Research - Nonembryonic - Non-Human	\$613	\$627	\$632	\$652	\$681	\$528
Stem Cell Research - Umbilical Cord Blood/ Placenta	\$40	\$34	\$35	\$42	\$43	\$33
Stem Cell Research - Umbilical Cord Blood/ Placenta - Human	\$35	\$28	\$32	\$33	\$34	\$27
Stem Cell Research - Umbilical Cord Blood/ Placenta - Non-Human	\$7	\$7	\$6	\$10	\$11	\$8

Estimates of Funding for Various Research, Condition, and Disease Categories (RCDC)

Table Published: July 3, 2017

https://report.nih.gov/categorical_spending.aspx

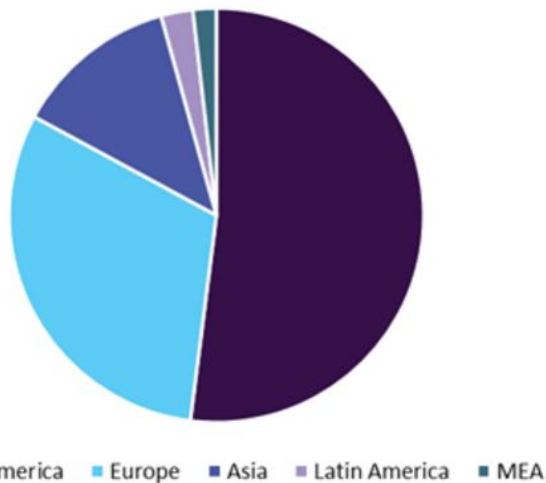
Практика



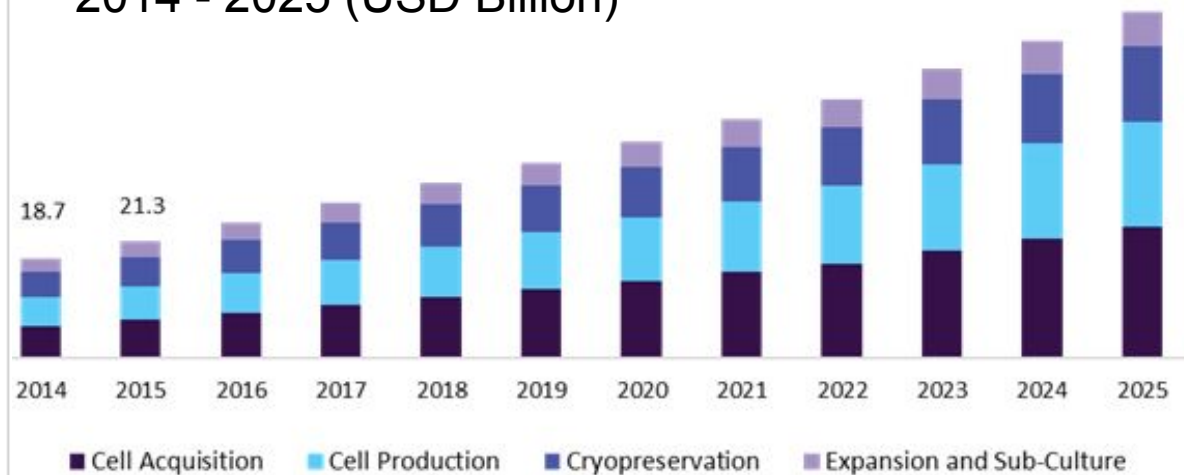
from the Stem Cell Summit 2007 Fact Sheet: <http://www.stemcellsummit.com/2007/stem-cell-fact-sheet.pdf>

Практика

Global stem cell market, by region, 2016 (%)



UK stem cells market share, by technology, 2014 - 2025 (USD Billion)



Stem Cells Market Analysis By Product (Adult Stem Cells, hESC, Induced Pluripotent Stem Cells), By Application (Regenerative Medicine, Drug Discovery), By Technology, By Therapy, And Segment Forecasts, 2014 – 2025.

<http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/stem-cells-market>

Практика. Банки стволовых клеток

БиоБанк – персональное/неперсональное хранилище образцов СК:

- Банки пуповинной крови
- Банки ККМ



Практика. Банки стволовых клеток



Набор для заготовки СК



MediStem, США

Противоречие

Evidence of a Pluripotent Human Embryonic Stem Cell Line Derived from a Cloned Blastocyst

Woo Suk Hwang,^{1,2*} Young June Ryu,¹ Jong Hyuk Park,³
Eul Soon Park,¹ Eu Gene Lee,¹ Ja Min Koo,⁴ Hyun Yong Jeon,¹
Byeong Chun Lee,¹ Sung Keun Kang,¹ Sun Jong Kim,³ Curie Ahn,⁵
Jung Hye Hwang,⁶ Ky Young Park,⁷ Jose B. Cibelli,⁸
Shin Yong Moon^{5*}

Somatic cell nuclear transfer (SCNT) technology has recently been used to generate animals with a common genetic composition. In this study, we report the derivation of a pluripotent embryonic stem (ES) cell line (SCNT-hES-1) from a cloned human blastocyst. The SCNT-hES-1 cells displayed typical ES cell morphology and cell surface markers and were capable of differentiating into embryoid bodies in vitro and of forming teratomas in vivo containing cell derivatives from all three embryonic germ layers in severe combined immunodeficient mice. After continuous proliferation for more than 70 passages, SCNT-hES-1 cells maintained normal karyotypes and were genetically identical to the somatic nuclear donor cells. Although we cannot completely exclude the possibility that the cells had a parthenogenetic origin, imprinting analyses support a SCNT origin of the derived human ES cells.

Science, 2005



Противоречие



S Korea scientist on fraud charge

12 May 2006, 04:11 GMT 05:11 UK



The South Korean cloning scientist who faked his stem cell research has been charged with fraud and embezzlement.

Hwang Woo-suk was also charged with using millions of dollars in grants for private purposes, as well as violating laws on bio-ethics.



Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors

Kazutoshi Takahashi¹ and Shinya Yamanaka^{1,2,*}

¹Department of Stem Cell Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

²CREST, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi 332-0012, Japan

*Contact: yamanaka@frontier.kyoto-u.ac.jp

DOI 10.1016/j.cell.2006.07.024

Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report



Steven D Schwartz, Jean-Pierre Hubschman, Gad Heilwell, Valentina Franco-Cardenas, Carolyn K Pan, Rosaleen M Ostrick, Edmund Mickunas, Roger Gay, Irina Klimanskaya, Robert Lanza

Summary

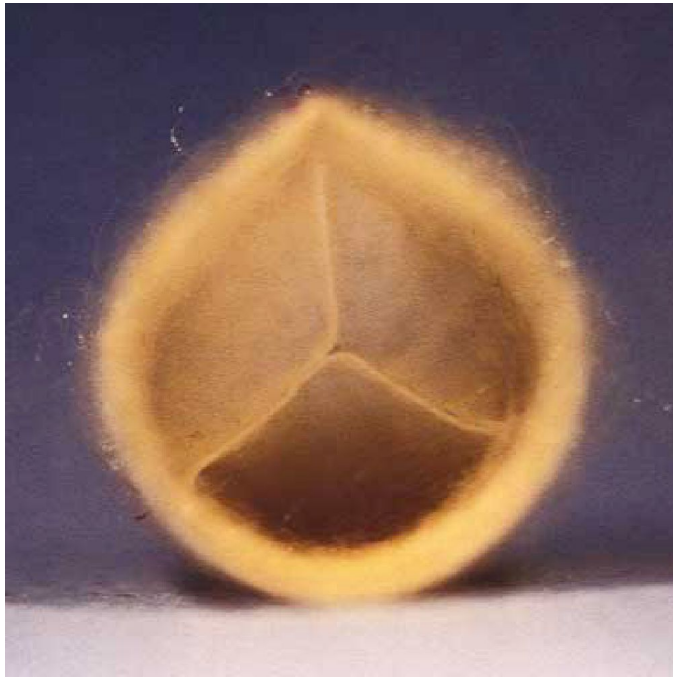
Background It has been 13 years since the discovery of human embryonic stem cells (hESCs). Our report provides the first description of hESC-derived cells transplanted into human patients.

Published Online
January 23, 2012
DOI:10.1016/S0140-

Успех



Тканевая инженерия



Т.И. – раздел биотехнологии, основной целью которого является разработка методов создания тканеподобных структур.

Продукты Т.И. Применяются не только в области трансплантологии, но и в различных сферах биомедицины

Историческая справка

1963 г. – Till и McCulloch доказательство существования ГСК

1968 г. – первая неродственная пересадка КМ

1970-е гг. – открыты стромальные стволовые клетки КМ

1978 г. – выделены клетки пуповинной крови

1981 г. – получены ES мыши

1988 г. – успешная трансплантация СК пуповинной крови при анемии.
Получены СК из периферической крови под действием G-CSF

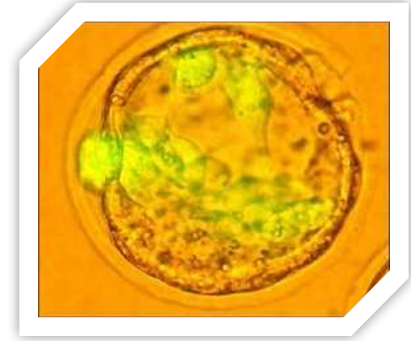
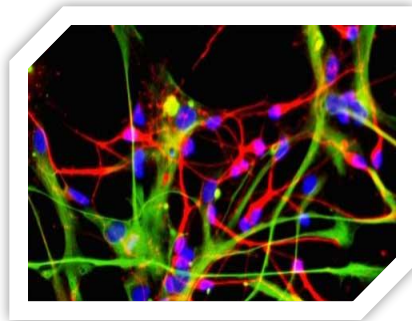
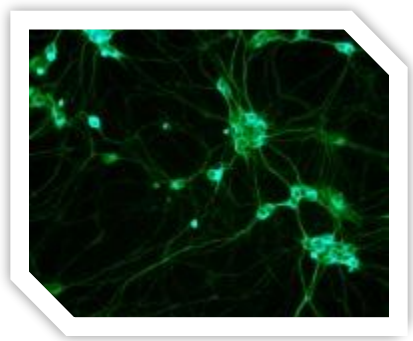
1992 г. – впервые получены нейрональные СК

1994 г. – выявление раковых СК

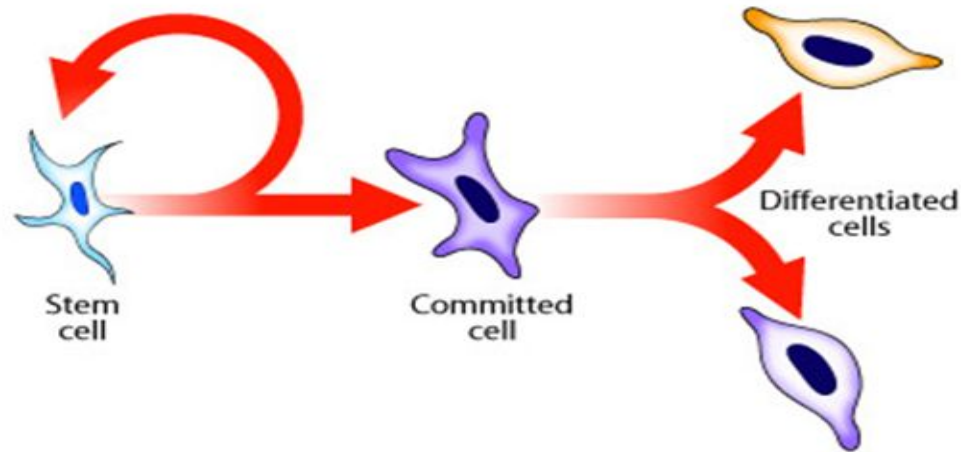
1996 г. – клонирование овцы

2004 г. – более 400 тысяч образцов СК хранится в банках и используется для трансплантации

Стволовые клетки

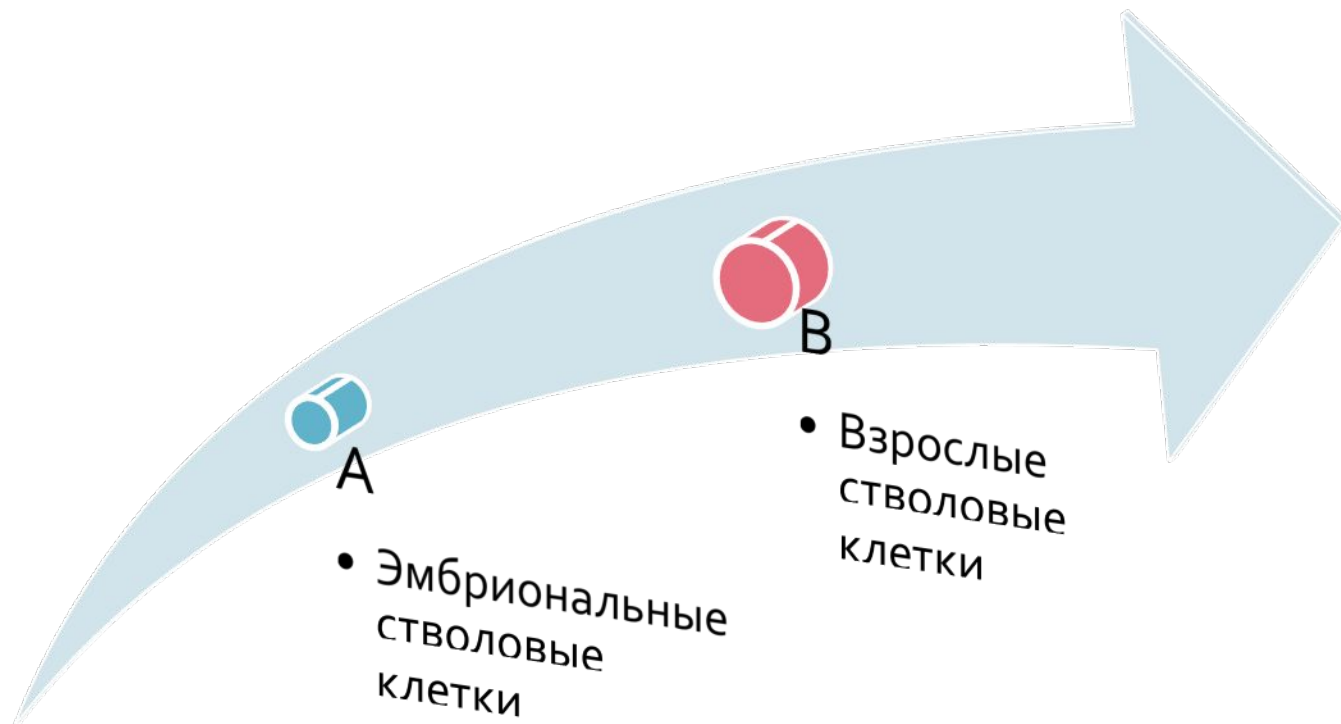


Стволовая клетка



Стволовые клетки – недифференцированные, способные к самообновлению и дифференцировке клетки

Основные типы



Основные типы

Эмбриональные стволовые клетки
Embryonic Stem (ES) cells

Внутренняя клеточная масса
бластоцисты
плюрипотентны

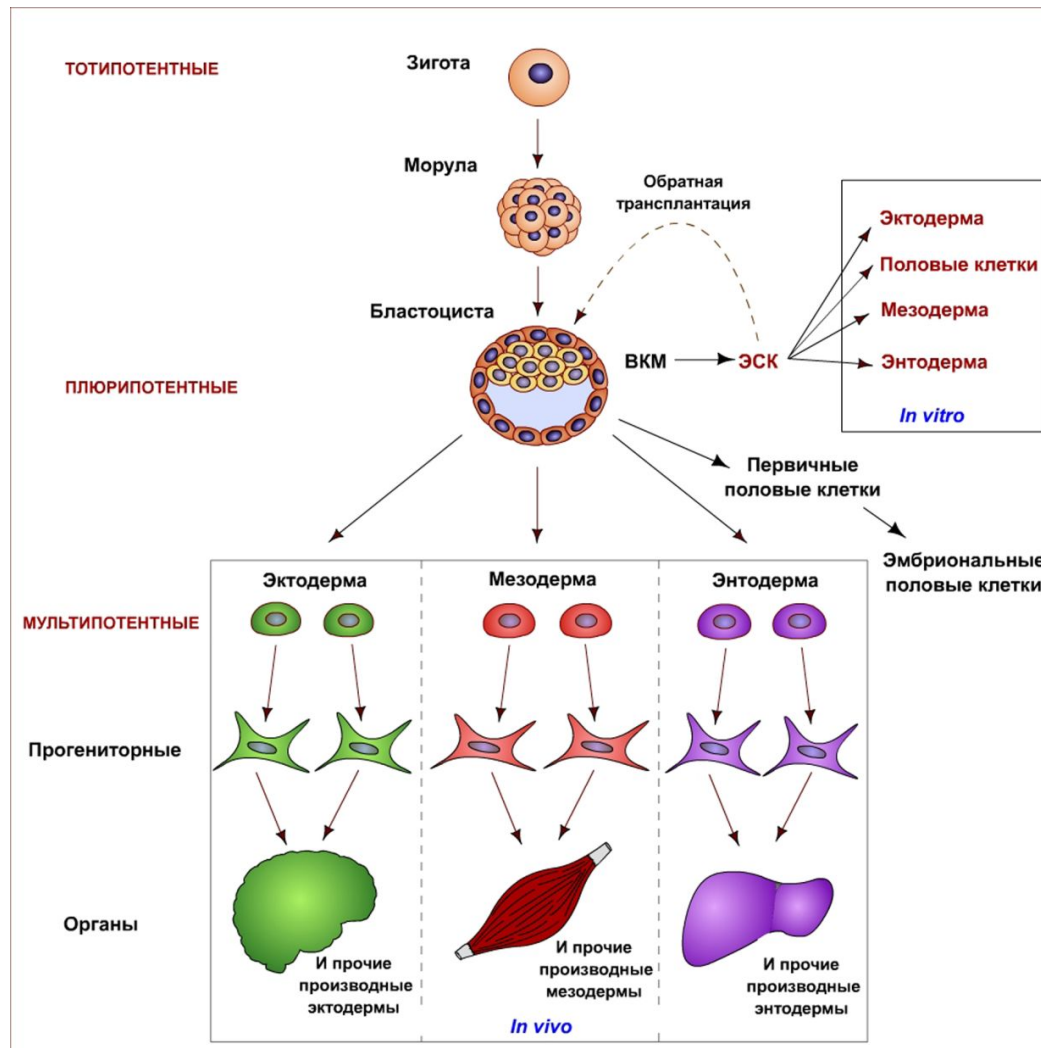
Эмбриональные половые клетки
Embryonic Germ (EG) cells

Первичные половые клетки зародыша
плюрипотентны

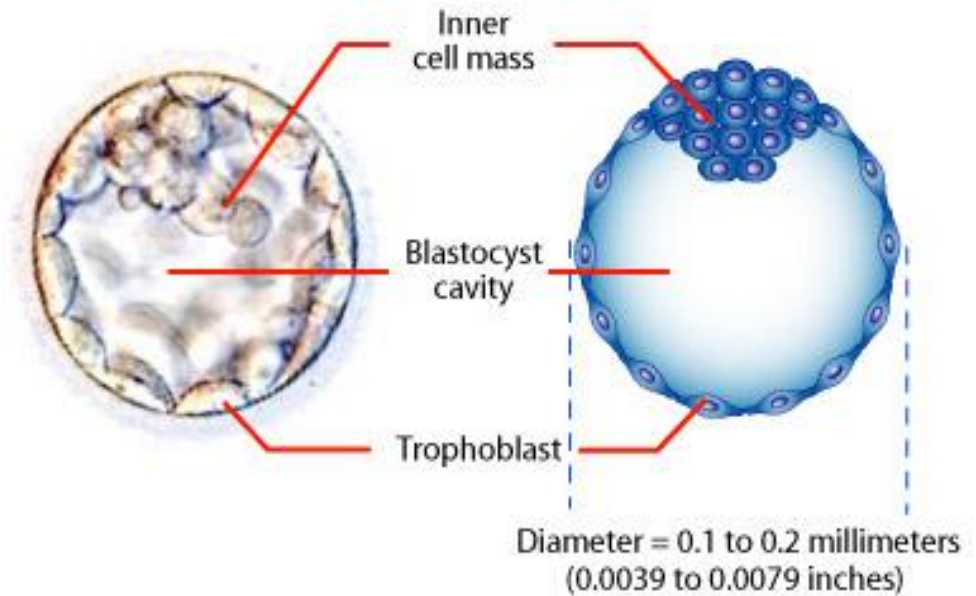
Стволовые клетки взрослого организма
Adult stem cells

Сформированные ткани взрослого организма
унипотентны или мультипотентны

Классификация стволовых клеток

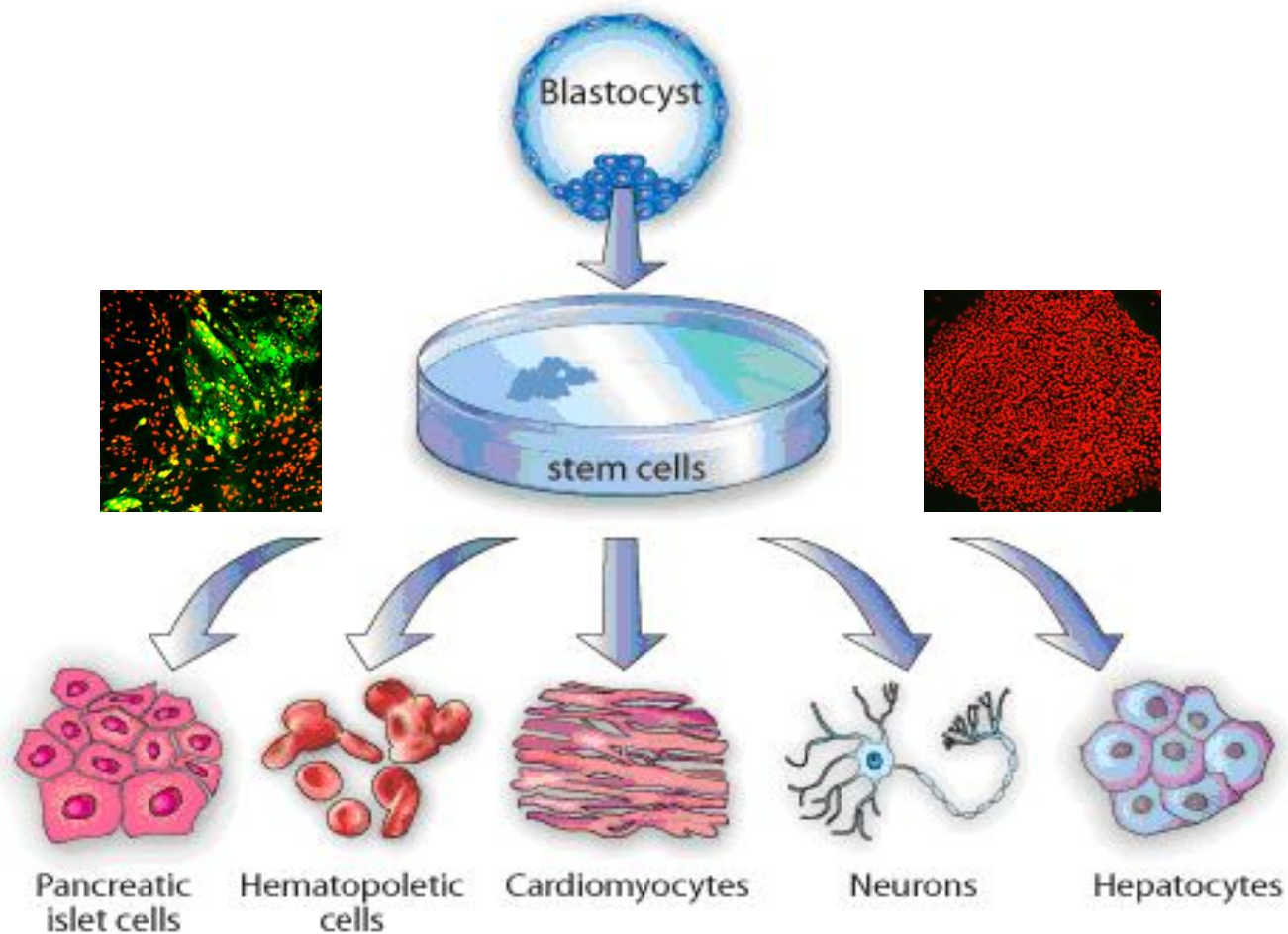


Бластоциста



- Эмбрион на 3-5 день развития
- Количество клеток около 100
- Полая сфера содержащая внутреннюю клеточную массу

Бластоциста



Свойства недифференцированных эмбриональных стволовых клеток

- 1855: Rudolf Virchow высказал гипотезу об эмбриональном происхождении опухолей
 - На основании микроскопических исследований образцов опухоли он выявил морфологическое сходство с развивающимся фетусом.
- Выделение тератомы – доброкачественные опухоли
Тератома представляет собой практически все типы клеток. Этот факт подтверждает что она может сформироваться из ранних стволовых клеток (ЭСК)

Свойства недифференцированных эмбриональных стволовых клеток

- Тератома яичников
 - Зубы



Администрация Обамы профинансирует стволовые клетки

09.03.2009

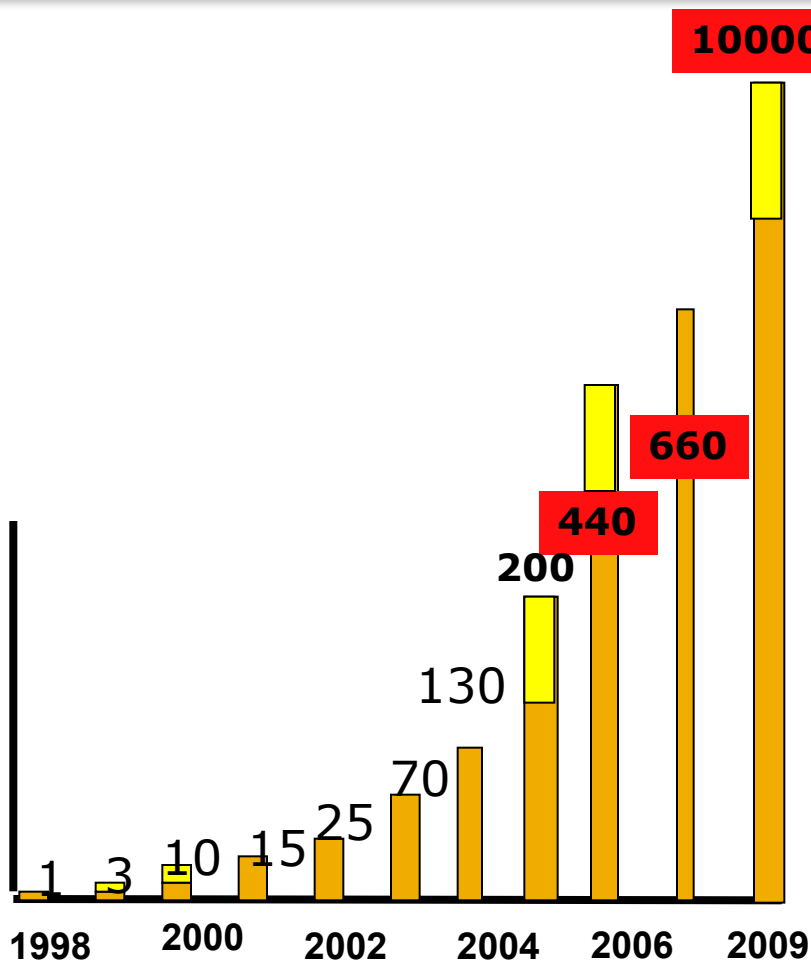
Обама разрешил
исследования
стволовых клеток
эмбриона человека



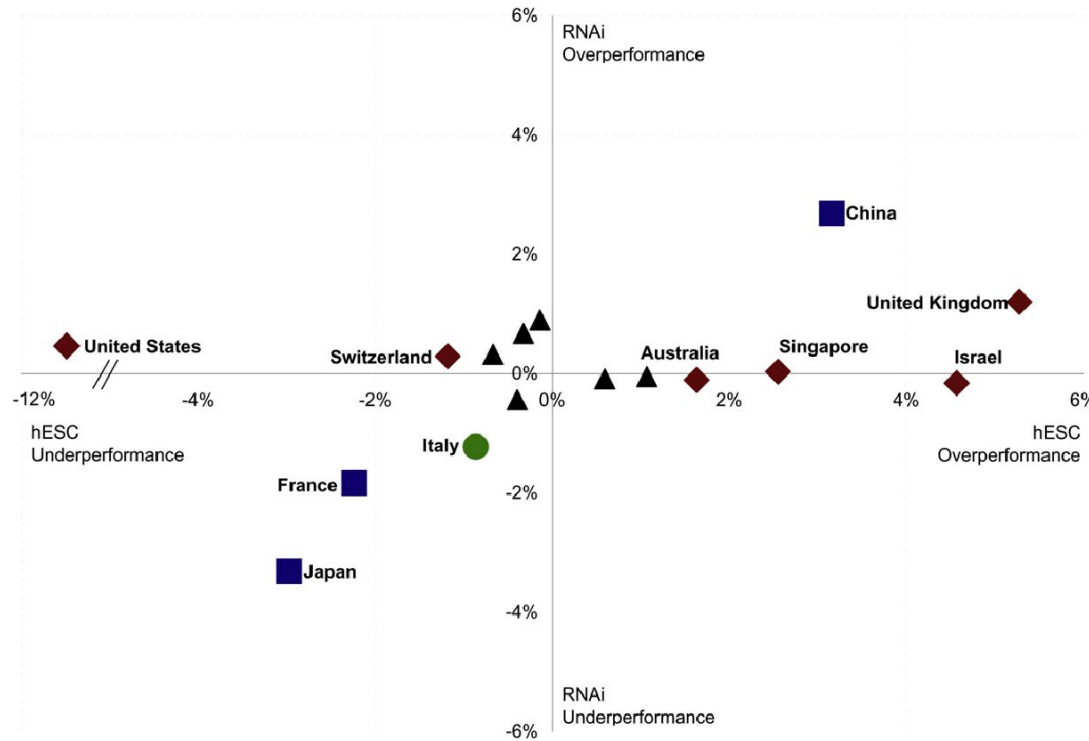
"Как верующий человек, я считаю, что мы призваны заботиться друг о друге и стараться облегчать человеческие страдания. Я уверен, что у нас есть способность и воля для продолжения этих исследований - равно как человечность и совесть для того, чтобы делать это ответственно",

Влияние государственной политики на науку и технологии

Cell Stem Cell 2, June 2008. p. 523



Ссылки в PubMed



В 1998 г были получены первые линии чЭСК и открыта инт.РНК. Для того чтобы США сегодня могли выйти на 0 точку, финансирование должно превосходить финансирование Англии и Сингапура в этих областях в 2-3 раза.

Ислам не против ЭСК

■ Иран

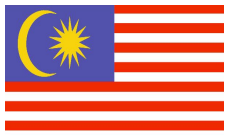
- Иран достиг значительного прогресса в доклинических исследованиях.
- Входит в топ 10 стран работающих с ЭСК.
- Значительного успеха добился в восстановлении спинного мозга после травмы

■ Egypt, Turkey and Malaysia

- Активно развивают программы стволовых клеток

■ Pakistan

- Принял решение в развитии этого направления



Эмбриональные стволовые клетки

1960е гг. – работы с линиями тератокарцином (ЕС) мыши, которые обладают способностью дифференцироваться (*B. Mintz*)

1961 г – первая в мире мышь-химера, образованная в результате слияния двух морул (*Tarkowski, A.K. Nature, 1961, 190:857*)

1967 г – линии клеток из бластоцисты кролика (*Cole, R. et al J.Dev.Biol. 1967, 13:385*)

1968 г. – первая мышь-химера, полученная в результате пересадки клеток ВКМ (*Gardner, R.L. Nature, 1968, 220:596*)

1977 г. – получены мыши-химеры из бластоцисты, в которую ввели клетки постоянной линии тератокарциномы (*Dewey et al., 1977*)

1981 г. – получены линии ES клеток мыши (*Martin 1981, PNAS 78:7634-38; Evans and Kaufman 1981, Nature 292:154-56*)

Эмбриональные стволовые клетки

1987 г. – изменили геном ES клетки путем гомологической рекомбинации (*Thomas KR and Capecchi MR 1987, Cell, 51:503-512*)

1989 г. – показали, что генетически измененные ES клетки, инъецированные обратно в бластоцисту, могут передавать эту мутацию в половые клетки и потомству (*Koller et al., 1989, PNAS, 86:8927-8931*)

1991 г. – получены EG клетки мыши (*Resnik 1992 Nature, 414:105-11; Matsui, 1992, Cell 70:841-47*)

1995 г. – получены ES клетки приматов (*Thomson JA et al., PNAS, 92:7844*)

1998 г. – получены ES клетки человека (*Thomson JA et al., Science, 282:1145*)

1998 г. – получены EG клетки человека (*Shamblott et al., 1998, PNAS, 95:13726*)

1978 г. – Нобелевская премия Эдвардсу за технологию ЭКО

Свойства недифференцированных эмбриональных стволовых клеток

Плюрипотентность (лат. *plures* - много) - способность дифференцироваться в любые клетки эмбриона (и взрослого организма)

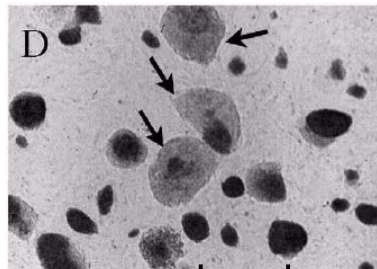
Самообновление и иммортальность – дочерние клетки могут оставаться стволовыми; *in vitro* клетки пролиферируют неограниченно долго.

Туморогенность – способность образовывать опухоли

Для дифференцировки необходим $H1$

Экспрессия маркеров ES клеток: Oct-4, Nanog, ERas, Rex-1, SSEA-1 - для мышей, **SSEA-3** - для человека

Повышенная активность **теломеразы**, активная **щелочная фосфатаза**.



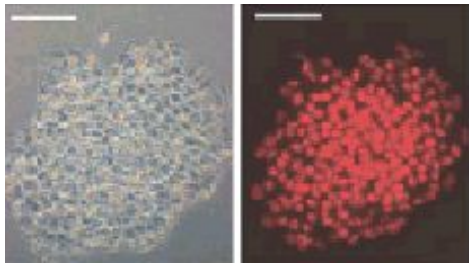
щелочная фосфатаза

Oct-4

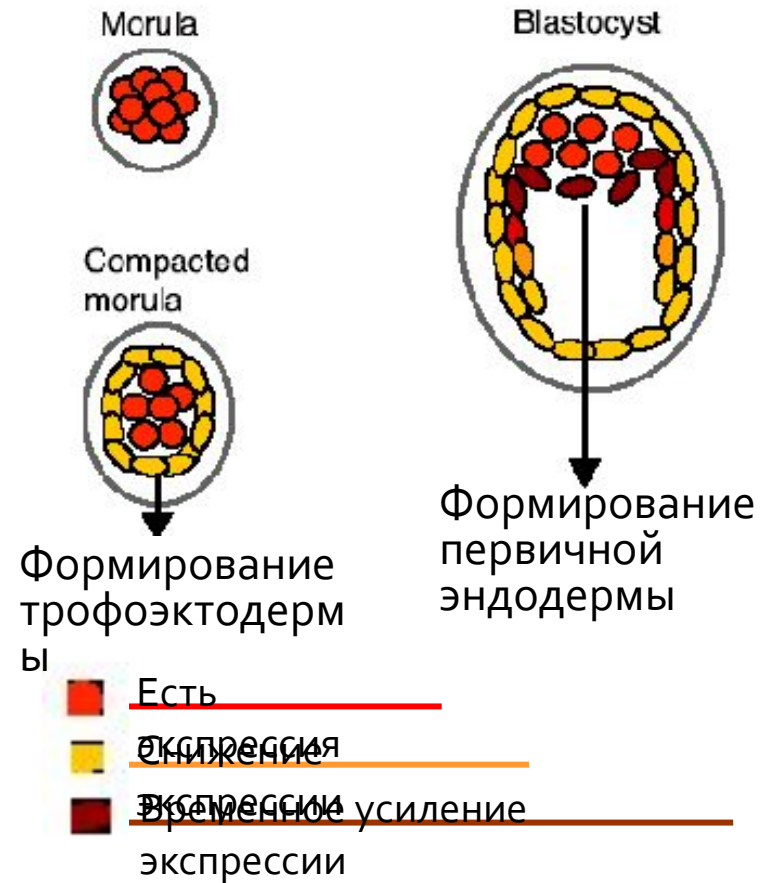
Принадлежит классу V POU-доменных транскрипционных факторов

Размер: 352 аминокислот

Экспрессия: мРНК есть в зрелом ооците, белок - в бластомерах, клетках внутренней клеточной массы. После гаструляции присутствует только в первичных половых клетках.



Им.фл. окраска ES клеток на Oct-4



Oct-4 -/- эмбрионы не способны образовать ВКМ, гибнут на стадии имплантации.

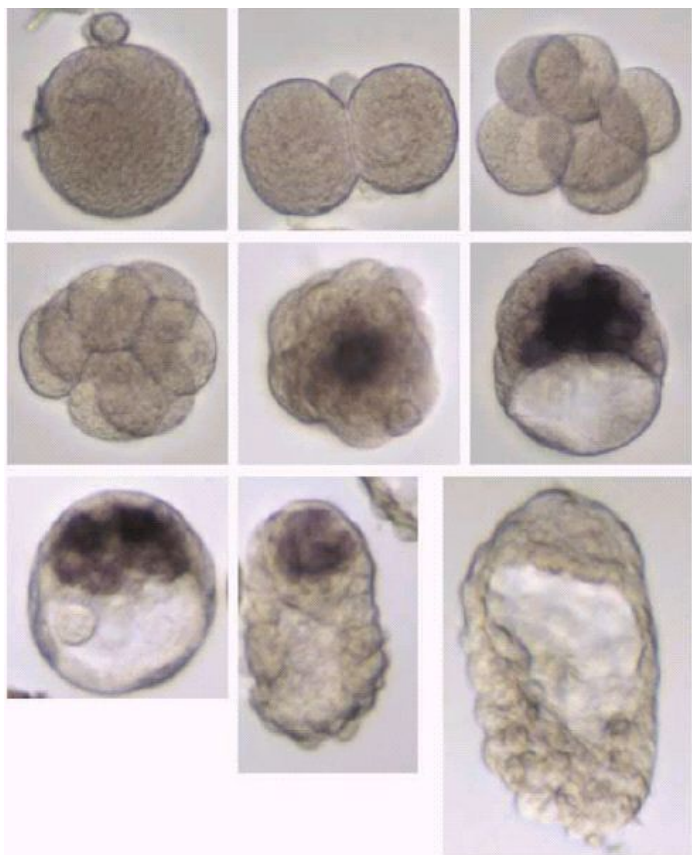
Недостаток Oct 4 заставляет бластомеры дифференцироваться в трофобласту.

Активен в комплексах Oct-4/Sox2; Oct-4/Oct-4; Oct-4/Oct-6; Oct-4/Oct-1

Nanog

Tir nan Og – в мифологии кельтов – Земля вечной юности

- Немецко транскрипционный фактор; клонирован и описан в 2003 году (*Chambers et al., Cell 113:643-655; Mitsui et al., Cell 113:631-642*)
- 305 аминокислот



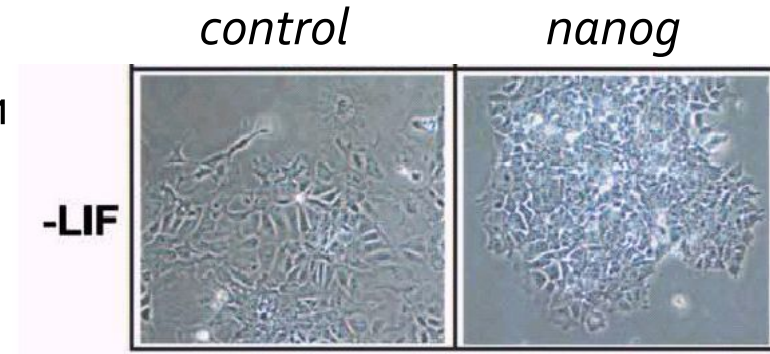
Экспрессия: морула, ВКМ, эпибласт, первичные половые клетки.

линии ES, EG, EC клеток.



Nanog

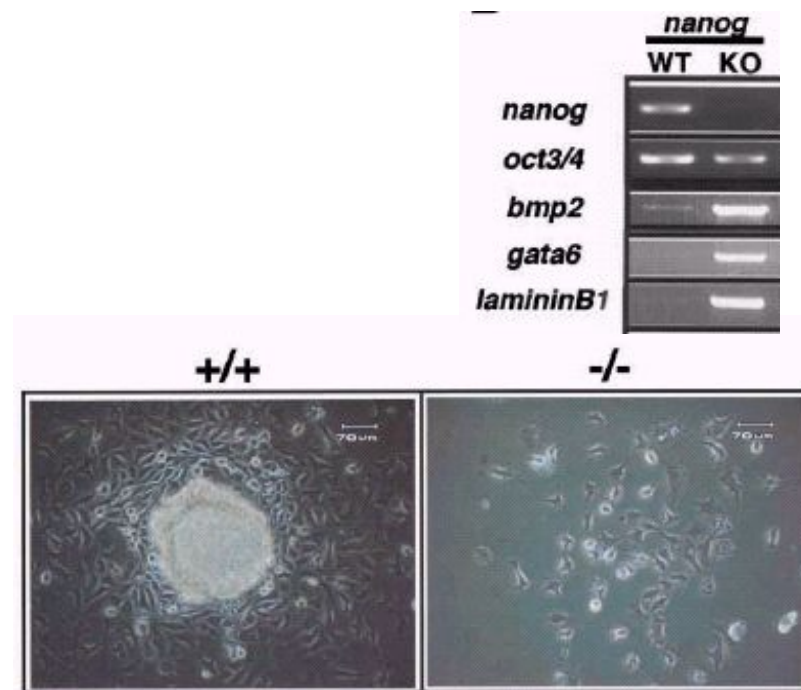
Сверхэкспрессия *nanog* поддерживает ES клетки в недифференцированном состоянии даже при культивировании без LIF (независимо от активности STAT3).

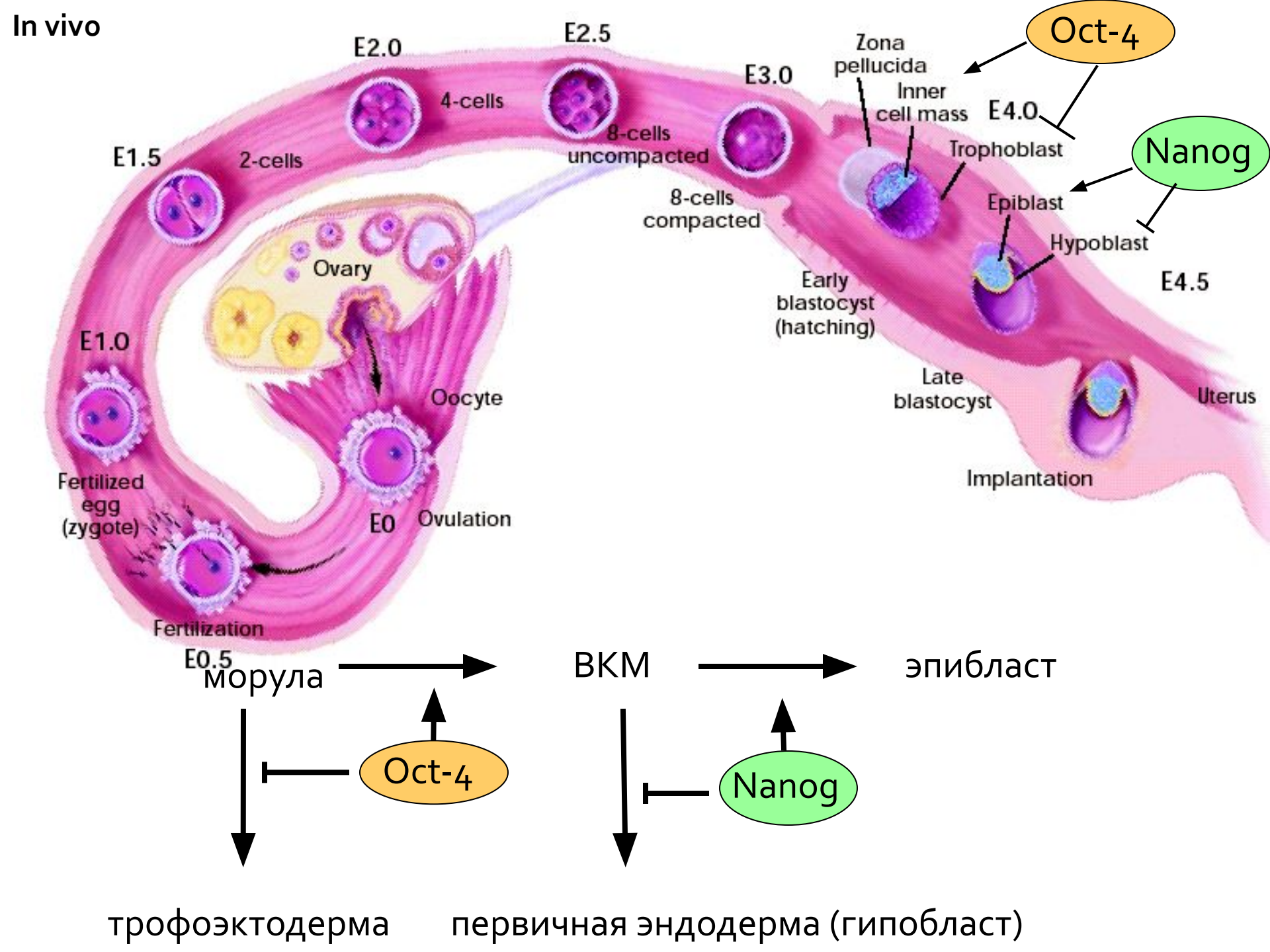


А вот отсутствие Oct-4 повышенная экспрессия *nanog* скомпенсировать не может – клетки всё равно дифференцируются.

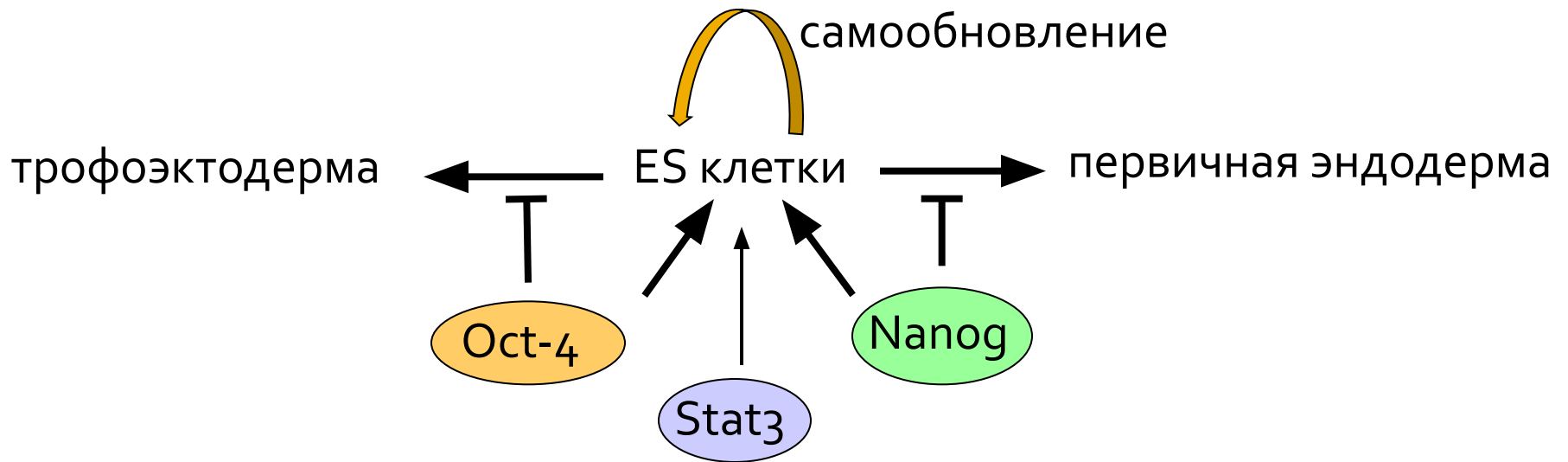
Nanog $-/-$ эмбрионы не развиваются, они не образуют ВКМ.

In vitro из Nanog $-/-$ бластоцист не удается получить популяцию недифференцированных ES клеток, все клетки превращаются в париетальную эндодерму.



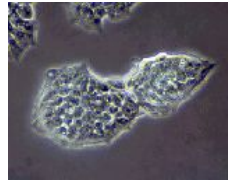


In vitro



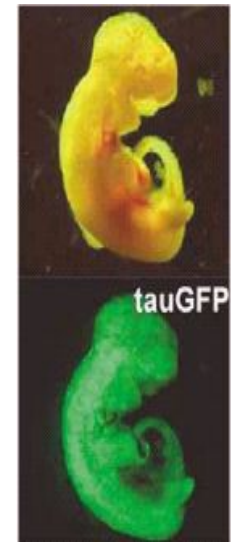
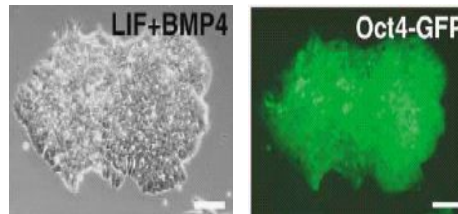
Культивирование ES клеток мыши

Желатин
Среда+SCF+LIF



Одного LIF без сыворотки
недостаточно для предотвращения
дифференцировки

Желатин
среда +LIF +BMP-4



Ying et al., 2003 Cell, 115:281-292