

A fluorescence microscopy image showing a network of cells. The cells are stained with green and blue dyes. The green staining highlights the cytoplasm and some organelles, while the blue staining highlights the nuclei. The overall appearance is that of a complex, interconnected cellular structure.

# **СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ**

**ПРИРОДА, ФУНКЦИИ,**

**КЛАССИФИКАЦИЯ**

**И**

**ПРОБЛЕМЫ КЛЕТОЧНОЙ**

**ТЕРАПИИ**

# Тело человека состоит из $10^{14}$ клеток

## СОМАТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ

Составляют все органы и ткани тела – объединяют около **350 типов специализированных (дифференцированных) клеток** организма. Имеют **диплоидный набор хромосом.**

## ПОЛОВЫЕ КЛЕТКИ (ГАМЕТЫ)

Их единственная функция – **обеспечить половое размножение.** Имеют **гаплоидный набор хромосом.**

## СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

**СТВОЛОВАЯ КЛЕТКА** – примитивная, незрелая, (недифференцированная) клетка, присутствующая в многоклеточном организме.

Она может длительное время сохранять способность к делению (самовоспроизведению), **оставаясь при этом в недифференцированном состоянии.**

В определенных условиях (под влиянием специфических химических сигналов), **СК** способна дифференцироваться, превращаясь в любой из 350 известных типов специализированных клеток.

Термин **«стволовая клетка»** происходит из работ цитологов XIX века, изучавших регенерацию растительных тканей, происходящая за счет камбиального слоя клеток.

## Историческая справка

- 1896 г. - **Вильсон**, изучая сперматогенез, высказал гипотезу о наличии в ткани СК, которые обеспечивают этот процесс.
- 1908 г. – на съезде Гематологического общества в Берлине, **Александр Максимов** обнародовал свою концепцию о существовании СК крови, которые являются источником гематопозеза. Благодаря работам А. Максимова термин «стволовая клетка» прочно вошел в современный научный лексикон.

- 20-30 годы – русский врач, эмигрант **Воронцов** успешно практикует в Париже – «сеансы омоложения» путем пересадки фетальных тканей. Считается «родоначальником» клеточной терапии.
- 1965 г.- В эксперименте доказано, что пересадка костного мозга может спасти крысу от лучевой болезни, вызванной смертельной дозой радиации.

- 1960 г. – Алтман и Дас открыли явление нейрогенеза у взрослого человека (существование СК в мозге). Это был удар по догме: «нервные клетки не восстанавливаются».
- 1963 г. – МакКалох и Тилл доказали самообновление клеток костного мозга мыши.
- 1963 г. – Первая попытка лечения саркомы введением пуповинной крови (собрана от 17 новорожденных) и достигнута временная ремиссия. Доказательство наличия в пуповинной крови некоего фактора, способного препятствовать канцерогенезу.

- 1968/69 гг. – **Томас** осуществил успешное лечение лейкемии путем пересадки костного мозга между родными братьями.
- 1970 г. – успешное лечение лейкемии путем введения пуповинной крови.
- Начало 70-х гг. – **Эванс, Кауфман и Мартин** ввели термин «эмбриональная стволовая клетка» - её источник «внутренняя клеточная масса» из бластоциста.
- 1974/76 гг. – **Александр Фриденштейн** и **Иосиф Чертков** обнаружили СК в строме костного мозга взрослого человека: «стромальные клетки». Доказано существование СК во взрослом организме.

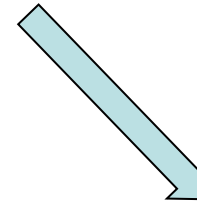
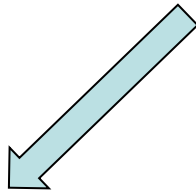
- 1978 г. – в крови пупочного канатика человека обнаружены гематопозитические СК.
- 1981 г. - **Мартин Эванс** (США) – разработал протокол получения ЭСК из бластоциста **МЫШИ.**
- 1988 г. – **Элиан Глюкман** (Франция) – первое успешное введение пуповинной крови для лечения анемии у детей (сделано более 1000 таких пересадок).
- **1988 г.**- получена первая линия СК мышей.
- 1997 г. – доказано происхождение лейкемии из гематопозитических СК (есть СК рака).



- **1998 г.** – **Джеймс Томсон** и **Джон Беккер** (США) запатентовали 5 протоколов получения линий ЭСК человека.
- **1998 г.** – первая попытка лечения последствий инфаркта миокарда с помощью СК.
- **1999 г.** – журнал **Science** назвал метод получения ЭСК человека 3-м по значимости событием в биологии XX века (после открытия структуры молекулы ДНК и расшифровки генома человека).
- **2000 г.** - первое сообщение о пластичности «взрослых» СК.

- 2001 г. – первая попытка лечения ИМ с помощью СК.
- 2003 г. – Сингтао Ни выделил СК из пульпы молочных зубов ребенка.
- 2007 г. – выделены СК из амниотической жидкости человека. Эти клетки могут стать альтернативой ЭСК.
- 2008 г. – Роберт Ланца предложил метод получения ЭСК человека без разрушения эмбриона.
- 9 марта 2009 г. – Б.Обама отменил запрет на исследования человеческих ЭСК.

# Классификация стволовых клеток



**I. ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ  
СТВОЛОВЫЕ  
КЛЕТКИ (ЭСК)**

**II. Adult stem cells  
(ПОСТНАТАЛЬНЫЕ,  
СОМАТИЧЕСКИЕ,  
РЕГИОНАЛЬНЫЕ)  
СТВОЛОВЫЕ  
КЛЕТКИ**

# **Эмбриональные СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ**

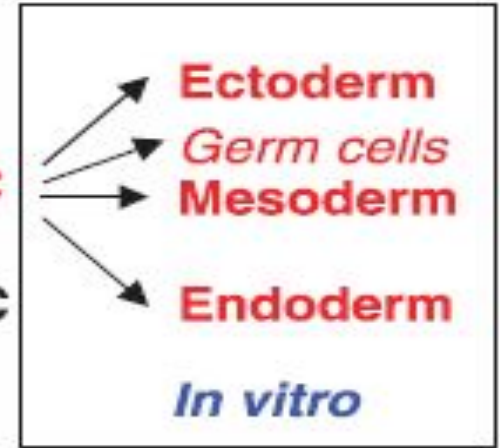
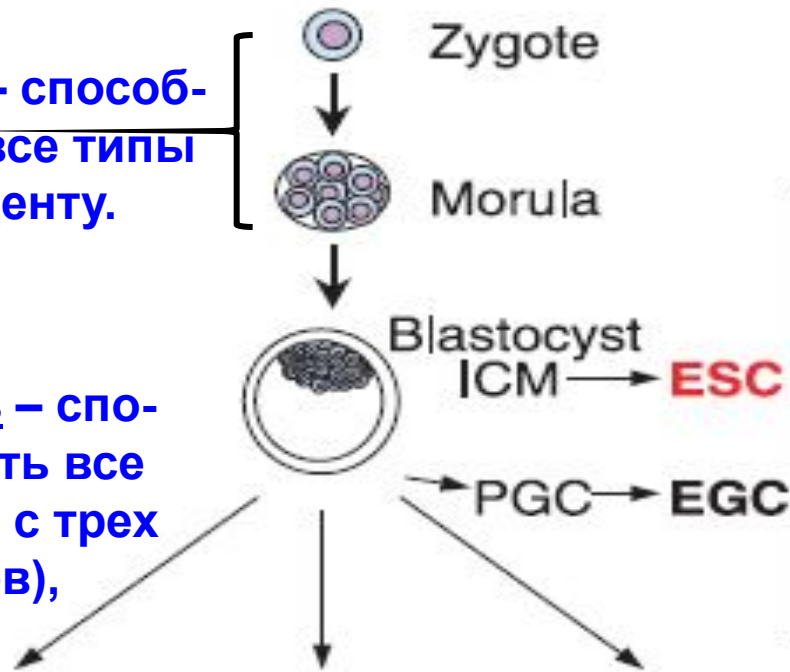
# I. Эмбриональные СК

Образуют «внутреннюю клеточную массу» (эмбриобласт) внутри **бластоциста** – стадия зародыша (эмбриона) до его внедрения в стенку матки (у человека – на 5-7 день после оплодотворения: 50-150 клеток). Эти клетки **плюрипотентны** - способны дать начало трем зародышевым листкам (экто-, мезо- и эндодерме) и всем 350 типам клеток организма, кроме плаценты.

Различают также **эмбриональные половые СК**, которые входят в состав гонадной бороздки 5-9 недельного плода. Эти клетки **мультипотентны** – способны увеличивать число клеток внутри какого-либо типа: кровь, кожа и т.д.

**Totipotent**  
Тотипотентность – способность формировать все типы клеток, включая плаценту.

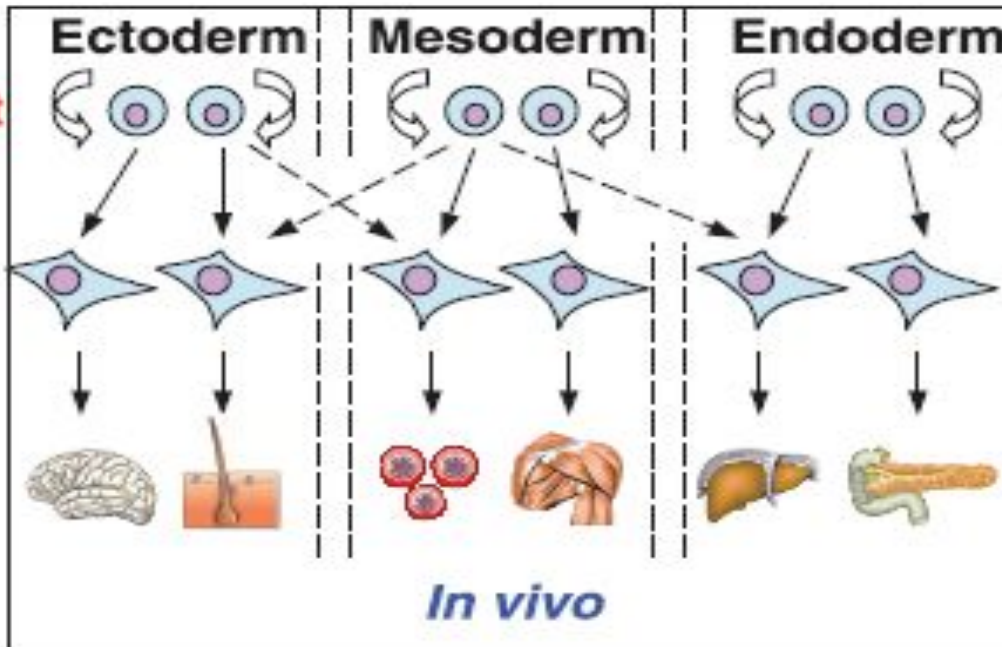
**Pluripotent**  
Плюрипотентность – способность формировать все типы клеток (начиная с трех зародышевых листков), кроме плаценты.



**Multipotent**

Progenitor

Organs



Мультпотентность – способность давать определенные типы клеток : клетки кожи, крови и т.д.

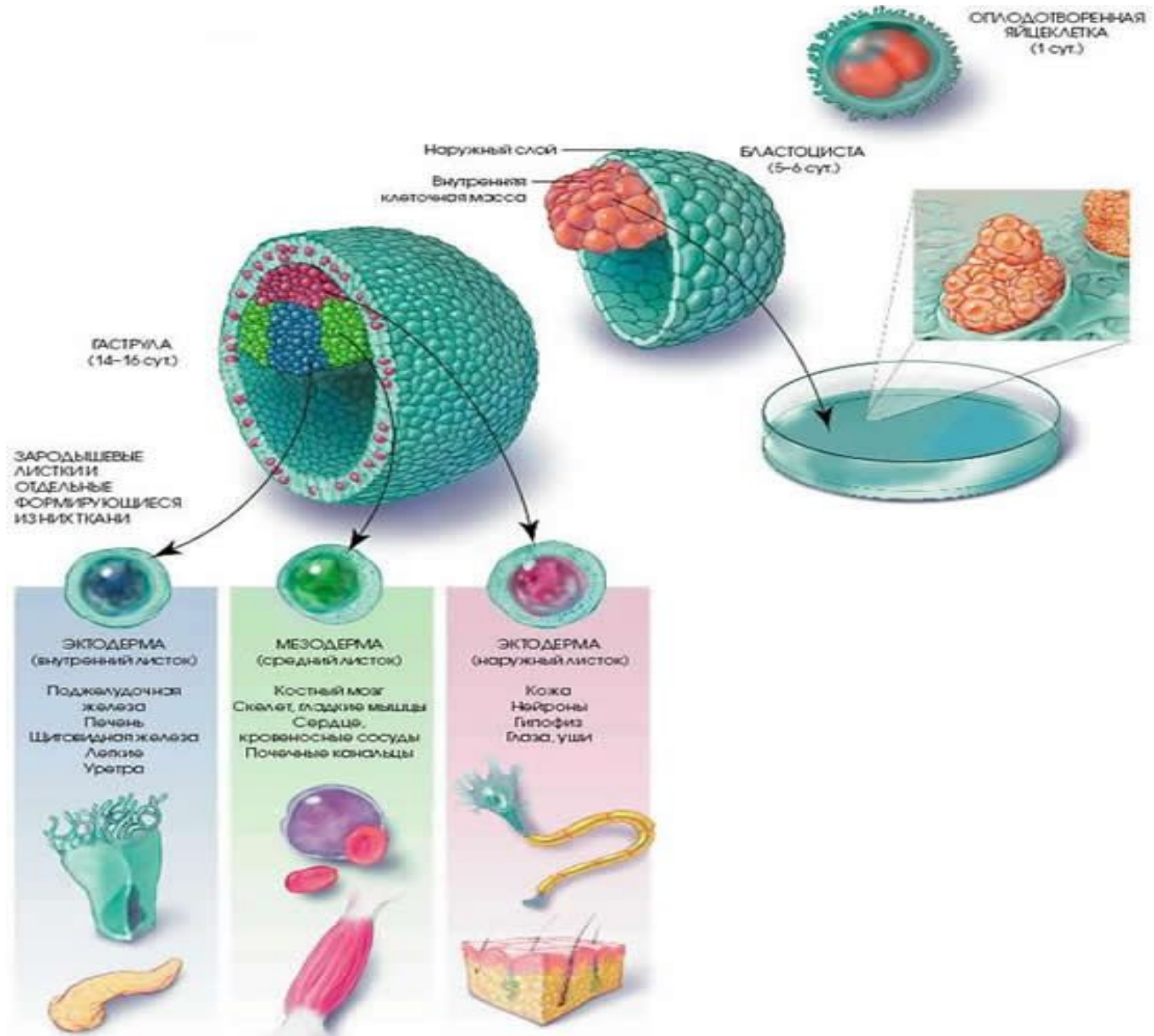
*Из схемы следует, что:*

- **тотипотентны** только те клетки, из которых состоит зародыш на стадии **морула** (8-16 клеточный эмбрион). Он состоит из **тотипотентных** клеток, т.е. способны давать начало абсолютно всем типам клеток (включая плаценту).
- эмбриональные СК (внутренняя клеточная масса в составе следующей стадии - **бластоцист**) – **плюрипотенты**.

**Термин «тотипотентная эмбриональная СК» - некорректен:**

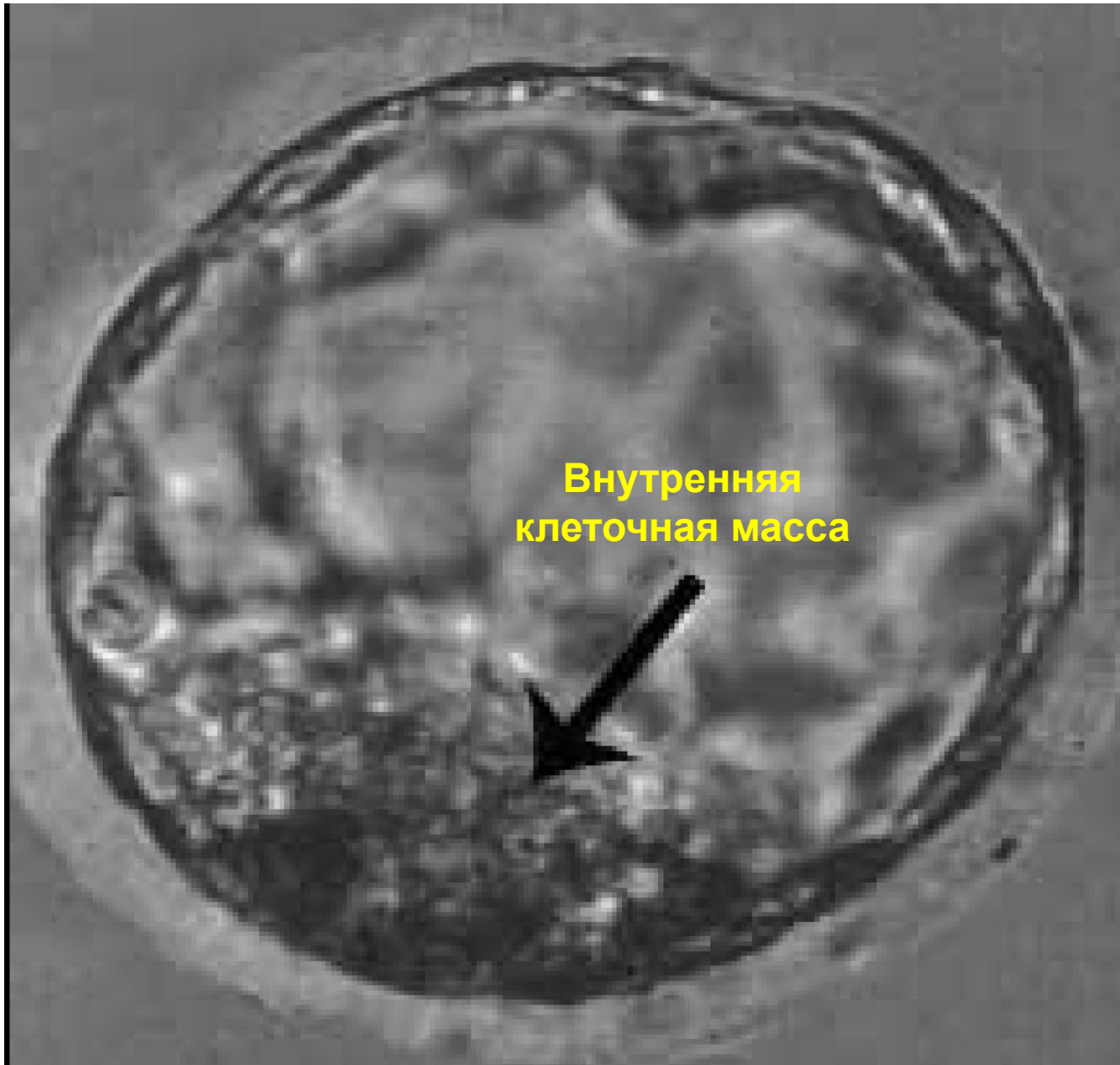
СК – уже не тотипотентны. Тотипотентны клетки на более ранней стадии развития зародыша (еще не «доросли» до СК) - морула. Клетки на стадии морулы следует называть **тотипотентные эмбриональные (зародышевые, но не стволовые) клетки**.

# Происхождение эмбриональных стволовых клеток

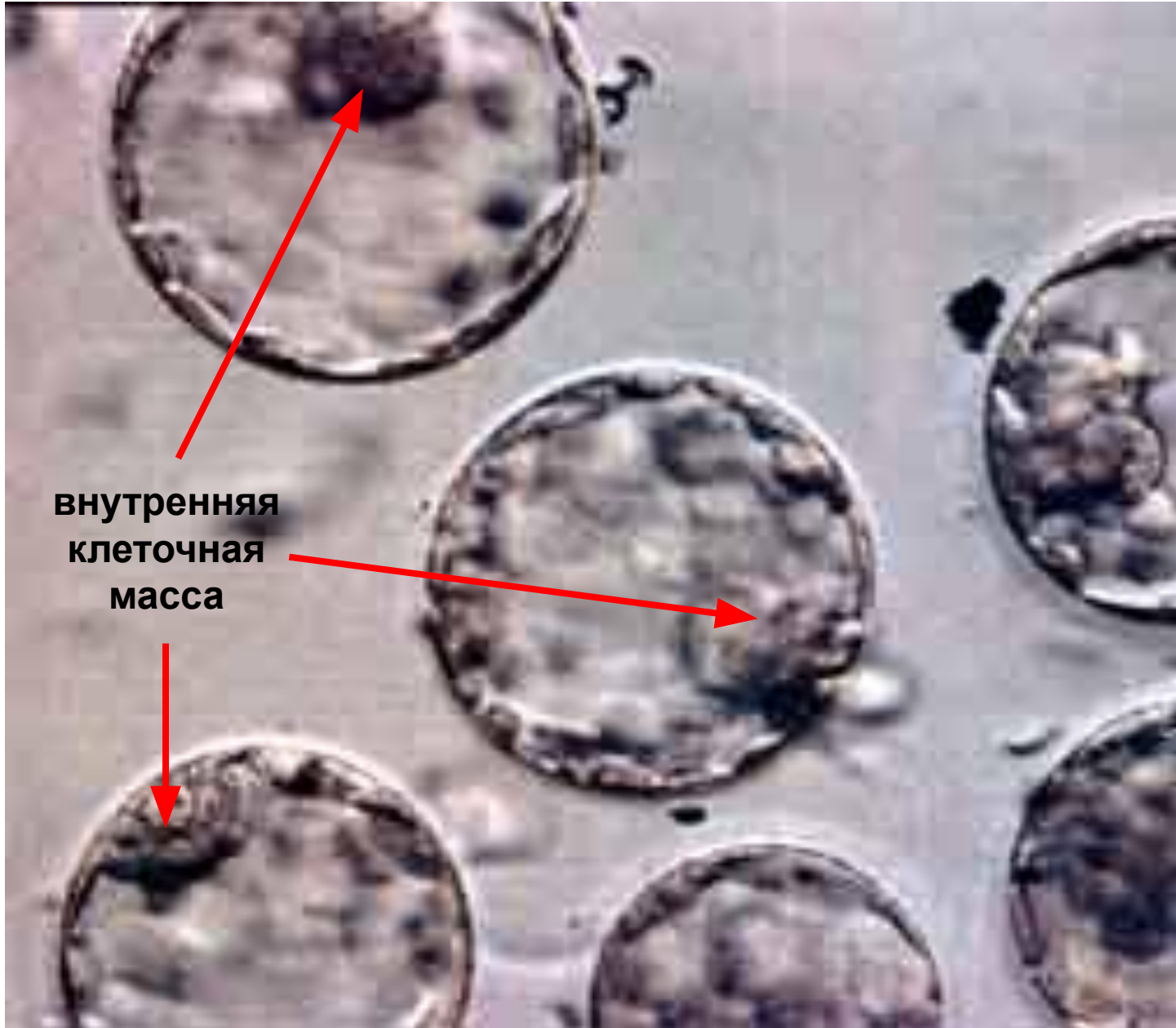




## Бластоциста млекопитающих



## Бластоцисты человека



**Бластоцист – состоит из 2-х типов клеток:**

**ЭСК и трофобластов.**

**Трофобласты образуют оболочку, питают ЭСК, участвуют в формировании плаценты, но никакого потомства уже не дают.**

**Т.о., не все типы клеток, порождаемые зиготой, включаются в сомю будущего организма.**

**ЭСК уже нельзя называть тотипотентными клетками,**  
**поскольку это свойство ЭСК уже потеряли.**

Геном **ЭСК** находится в «нулевой точке» ( $G_1$  – фаза клеточного цикла).

В **ЭСК** еще не включен механизм, определяющий ее будущую специализацию (соматические клетки – высокоспециализированы).

Единственная функция ЭСК – перенос генетического материала в ее последующие поколения и накопление этого материала.

## ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЭСК

(в равной мере этими свойствами должны обладать также линии ЭСК, полученные искусственно)

1. **Способность к многократному делению, оставаясь при этом в недифференцированном состоянии.** В культуре ЭСК способна дать  $> 300$  делений, что превышает **лимит Хейфлика** для культуры соматических клеток ( $\leq 250$  делений). Эта способность делает ЭСК практически бессмертной (иммортальной), что роднит ее с опухолевой клеткой.

- 2. Высокая активность теломеразы** (быстрое и эффективное восстановление длины теломера хромосомы), что объясняет способность ЭСК к многократному самокопированию.
- 3. Плюрипотентность.**
- 4. Сохранение неповрежденного кариотипа** (отсутствие хромосомных aberrаций) после многократных делений.

5. Способность формировать **тератому** после введения в ткани иммунодефицитных мышей. Это доброкачественная опухоль, гистологически представляет собой хаотичную смесь дифференцированных клеток различных типов.
  
6. **Постоянная экспрессия поверхностных маркеров ЭСК**: в первую очередь – белок **oct4** (эмбриональный транскрипционный фактор) и др.
  
7. Способность **давать клоны** при выращивании в культуре.

8. Способность образовывать **химеру**: ЭСК от одной мыши вводятся в бластоцист другой мыши. Развивающийся организм несет в себе клетки «родные» и клетки из введенных ЭСК.
9. Способность образовывать **«эмбриональные тела»** - при определенных условиях в культуре формируется комок из ЭСК, которые начинают спонтанно дифференцироваться.
10. Известны около 140 поверхностных рецепторов, служащих маркерами ЭСК. Они служат для выделения и идентификации ЭСК.



# Механизмы поддержания «стволовости» (stemness) ЭСК

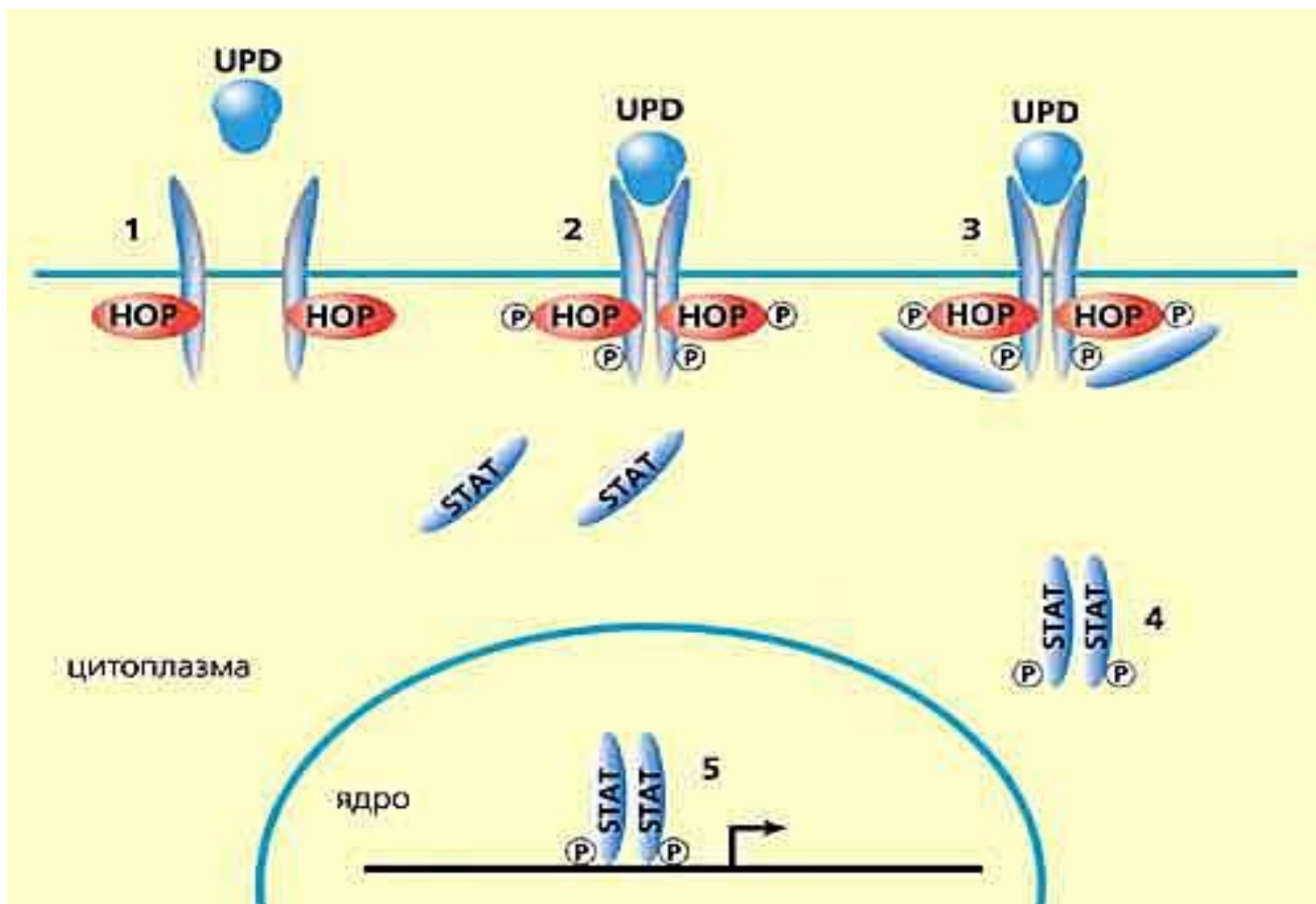
Сигнальные пути, опосредуемые Янус-киназой и транскрипционным фактором STAT.

Есть и другие механизмы:

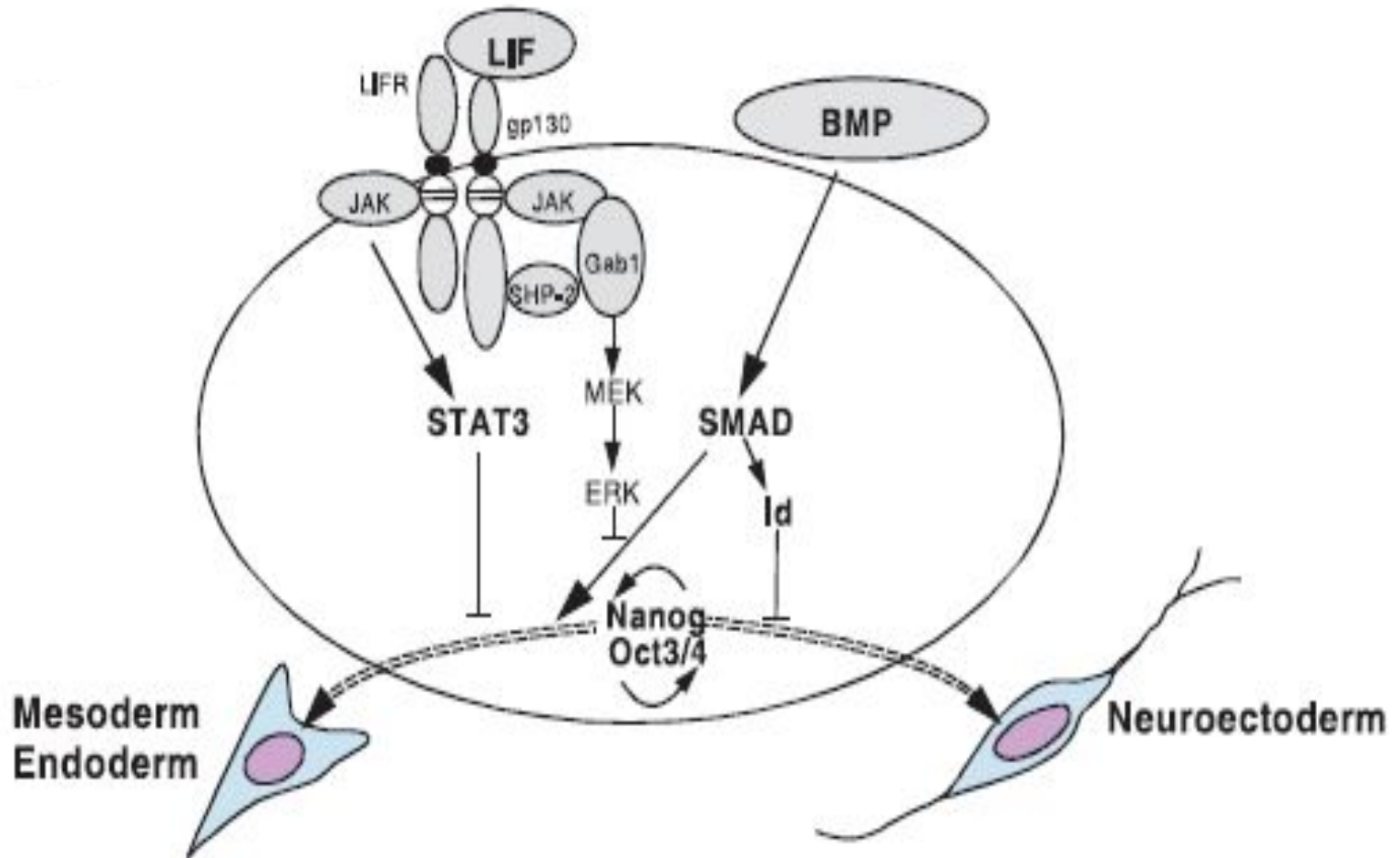
- факторы, индуцирующие ген, ингибирующий дифференцировку;
- Oct4/Nanog –зависимый путь

Клетка сохраняет свою «стволовость» до тех пор, пока функционируют такие сигнальные пути.

# Механизм поддержания «стволовости» СК семенников дрозофилы с участием Jak-STAT сигнального каскада



# Регуляция поддержания «стволовости» у мышинных ЭСК

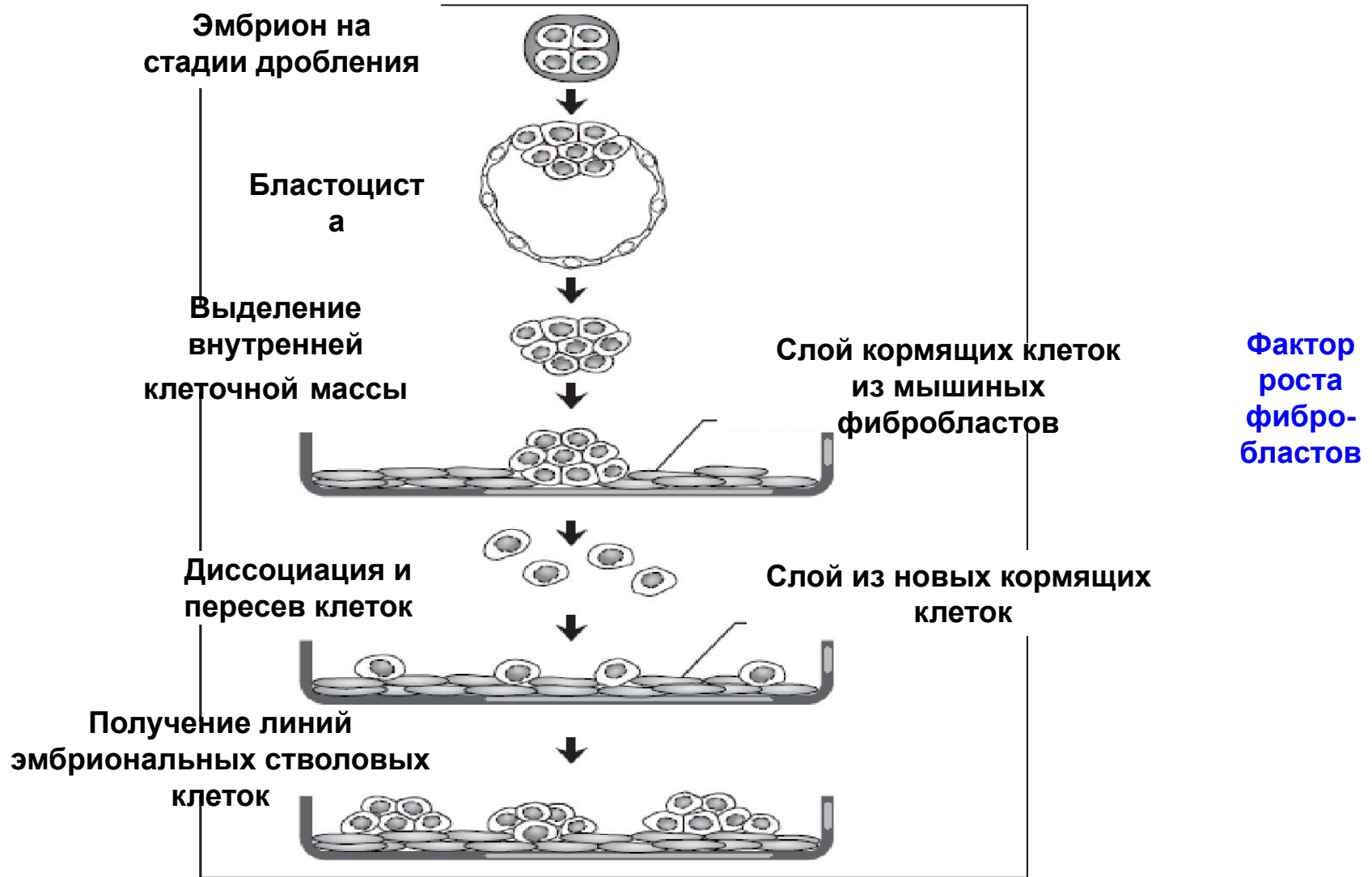


**Практика показала, что культивировать ЭСК гораздо сложнее, чем дифференцированные соматические клетки.**

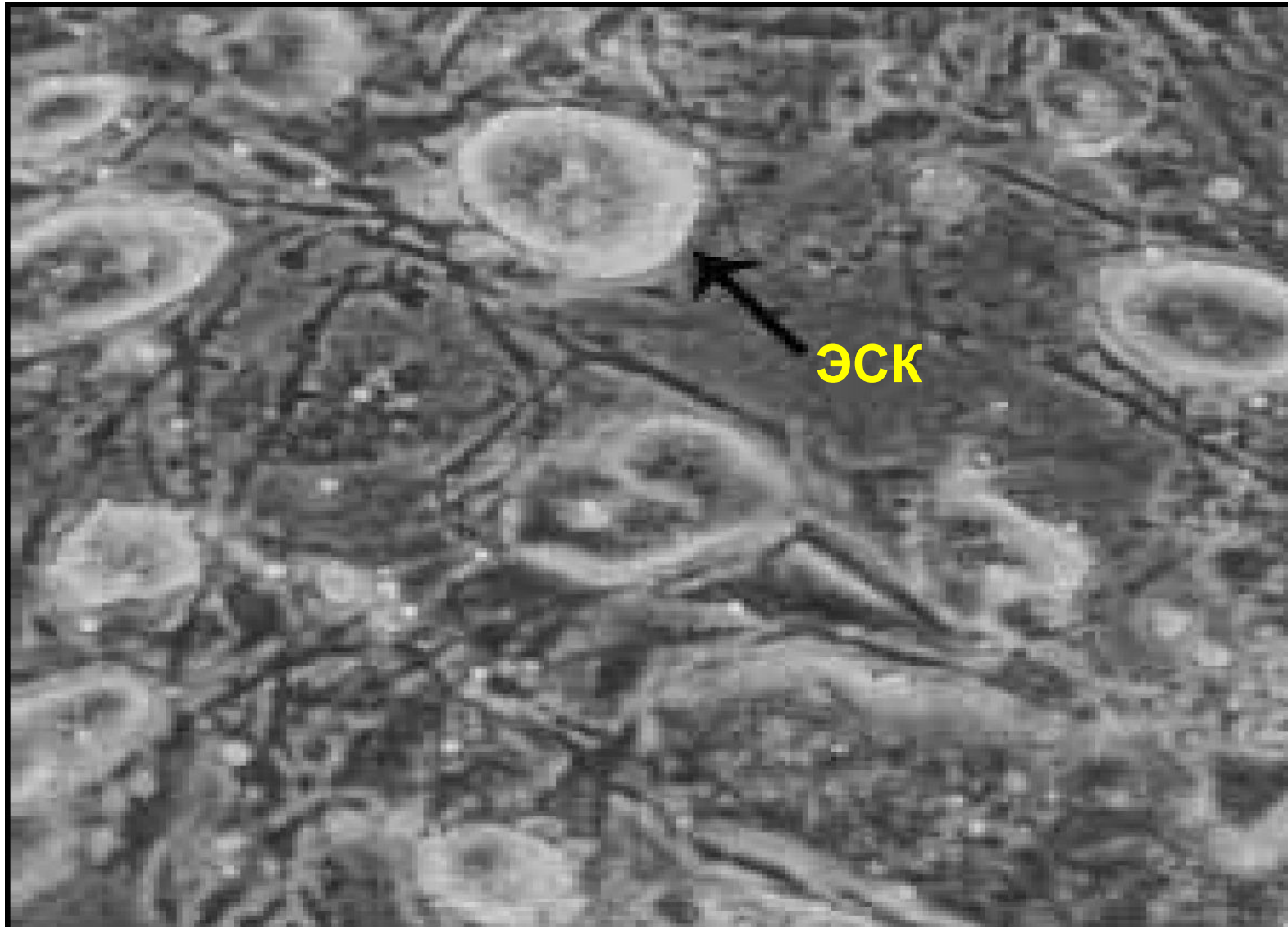
**ЭСК человека оказались гораздо «требовательнее», чем ЭСК животных.**

Основы технологии получения линий ЭСК и большинство культур ЭСК получены на **мышях**, в то время как культур крысиных ЭСК очень мало, хотя их свойства оказались в большей мере сходны с человеческими ЭСК.

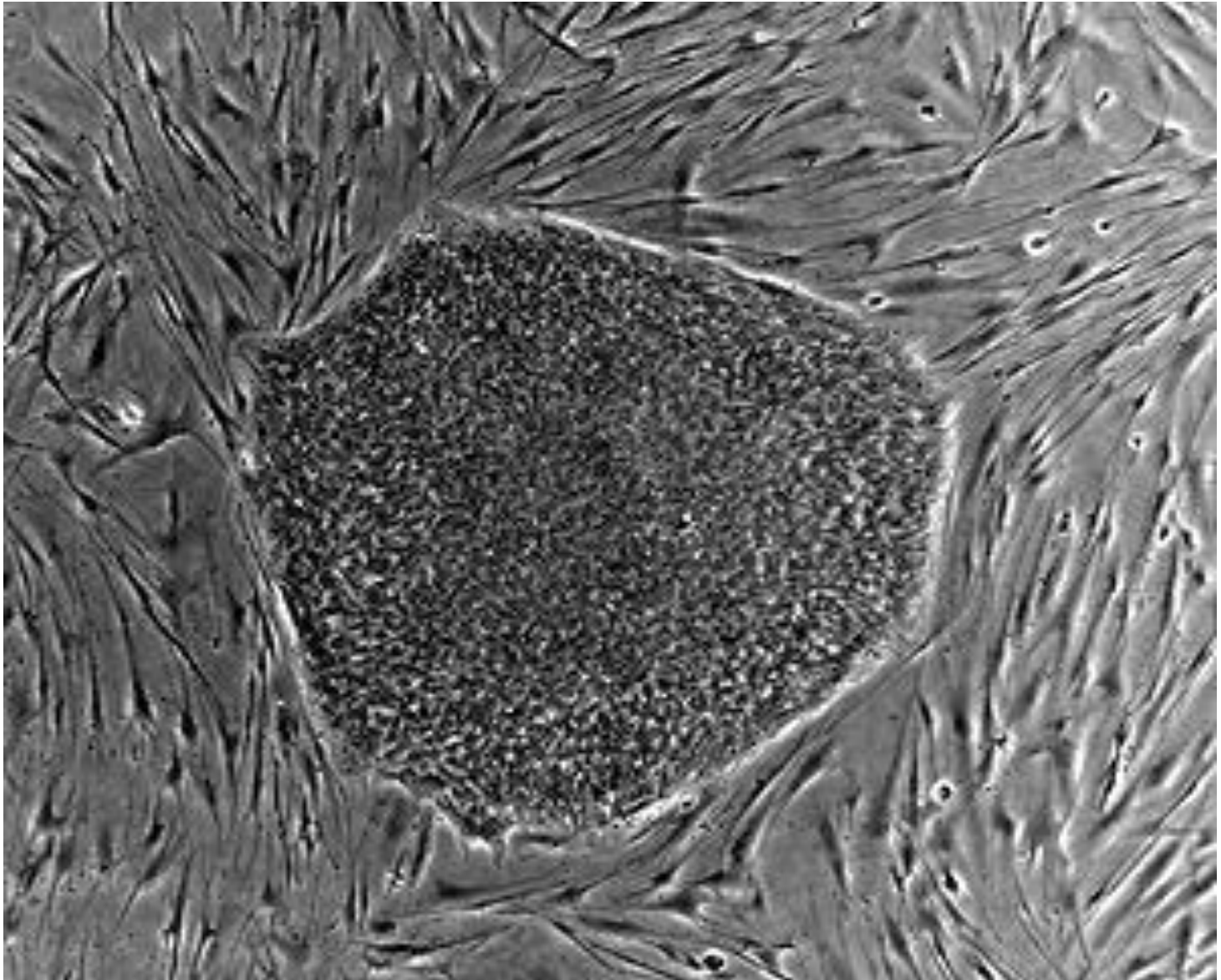
# Получение линий эмбриональных стволовых клеток человека



**Эмбриональные стволовые клетки,  
растущие на питающем слое из эмбриональных  
фибробластов**



**Колония человеческих эмбриональных СК на питающем слое из мышечных эмбриональных фибробластов**



**На сегодняшний день нет ни одной линии ЭСК, готовых для клинического применения.**

**В большинстве стран получение линий ЭСК человека – законодательно запрещено с 2001 года.**

**Сегодня мы не знаем полного перечня факторов, необходимых для успешного выращивания линий ЭСК и поддержания линии в стабильном «рабочем» состоянии.**

**До тех пор, пока мы не научимся полностью контролировать абсолютно весь процесс, включая 100% направленность дифференцировки – никакой клеточной терапии, как полноценной лечебной технологии на основе ЭСК, не будет.**



**Постнатальные  
стволовые  
клетки  
(adult stem cell)**

## II. Постнатальные СК = adult stem cell (обладают мультипотентностью)

- **Фетальные СК** – абортивный материал, 9-12 недели беременности. Можно рассматривать как промежуточный тип СК между эмбриональными и «взрослыми» СК.
- **СК пуповинной крови** – свежесобранная кровь сразу же после рождения ребенка. Считается сравнительно богатым источником СК.
- **Гемопоэтические СК** – циркулирующая кровь. Они дают начало всем клеткам красной и белой крови. Этот тип СК известен уже более 40 лет

- **Стромальные (мезенхимальные) СК – костный мозг. Здесь содержится большая часть СК взрослого организма:**
  - **кроветворные СК костного мозга**
  - **собственно мезенхимальные СК костного мозга. Эта разновидность СК способна регенерировать практически любую ткань. «Центральный склад запчастей».**
- **Нейрональные СК – головной мозг (дают начало как нейрональным, так и ненейрональным клеткам).**

- **Эпителиальные СК** – складки (крипты) слизистой оболочки тонкого кишечника. Дают начало многим типам клеток ЖКТ.
- **СК кожи** – базальная пластина эпидермиса, а также микрорегионы вокруг волосяных фолликулов. Дают начало кератиноцитам, которые мигрируют к поверхности кожи и формируют ее защитный слой.

Биологическая функция постнатальных СК – поддержание клеточного гомеостаза ткани путем замены мертвых или поврежденных клеток на новые клетки с теми же функциями.

**Постнатальные СК не способны устранять масштабные утраты клеток в ткани.**

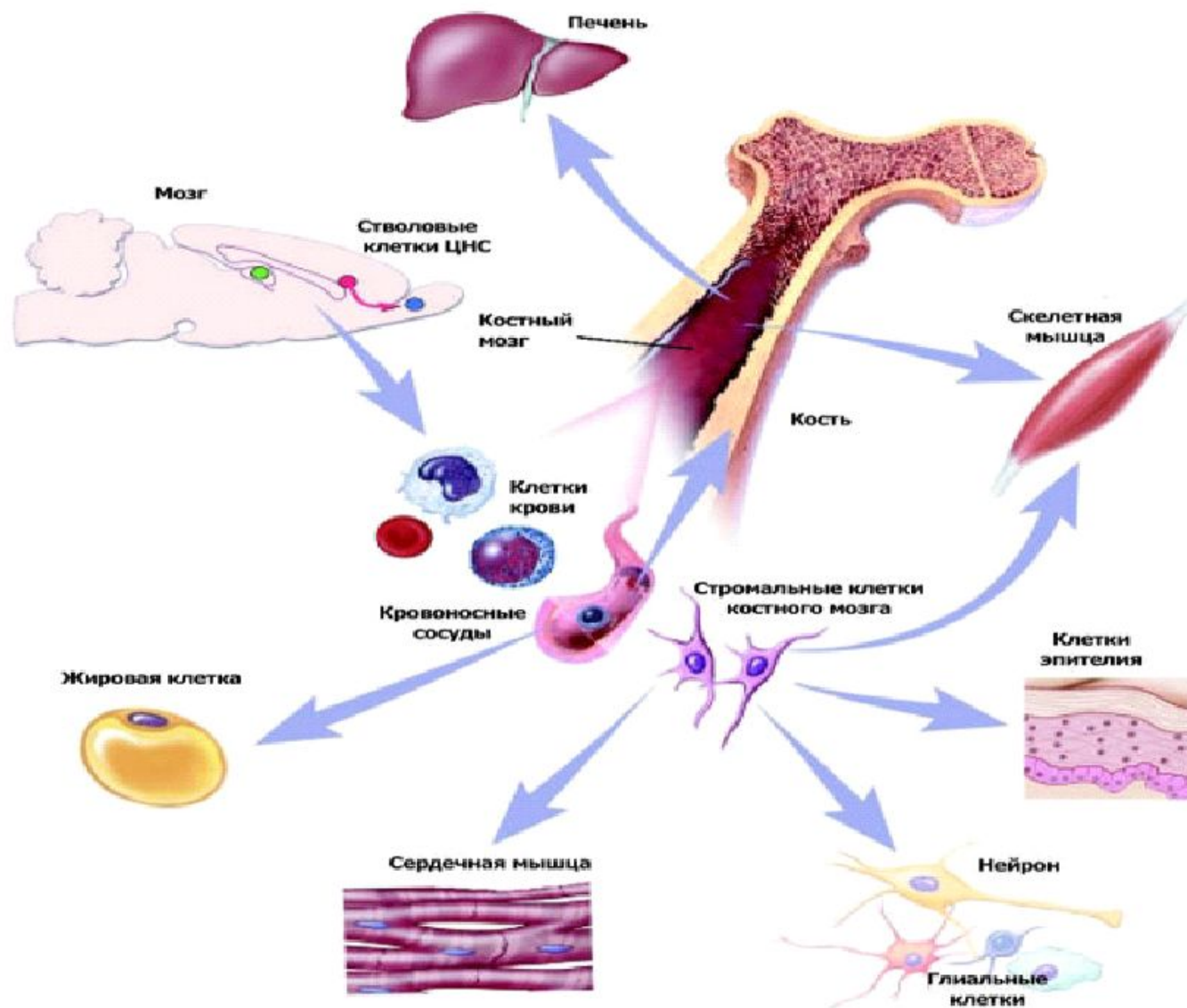
**Если для использования ЭСК в  
клеточной терапии существуют  
этические и религиозные запреты,  
обусловленные необходимостью  
разрушения бластоциты (извлечение  
внутренней клеточной массы), то  
постнатальные СК могут  
применяться без ограничений.**

Во взрослом организме наиболее богаты СК **кровь из пуповины** и, особенно,  
**КОСТНЫЙ МОЗГ.**

Так, стромальные СК костного мозга, называют «центральный склад запчастей», поскольку эти клетки способны дать начало практически любому типу соматических клеток – **пластичность**  
**постнатальных СК.**

В остальных тканях содержание СК составляет доли %.

# Пластичность взрослых (стромальных, региональных) стволовых клеток





# С возрастом число постнатальных СК уменьшается:

число СК в костном мозге:

Новорожденный .....	1 СК /10.000
Подросток.....	в 10 раз меньше
к 50 годам.....	1 СК /500.000
к 70 годам.....	1 СК /1.000.000

# Представления о «нише» СК

Постнатальная СК существует in vivo **в особом микроокружении – «нише»**. «Ниша» обеспечивает как сохранение главного свойства такой клетки – ее «стволовость» (stemness), так и запускает процесс её дифференциации.

Программа дифференцировки СК включается, если:

- СК покидает «нишу»
- СК перестает получать специальные сигналы, которые необходимы для поддержания стволоности.

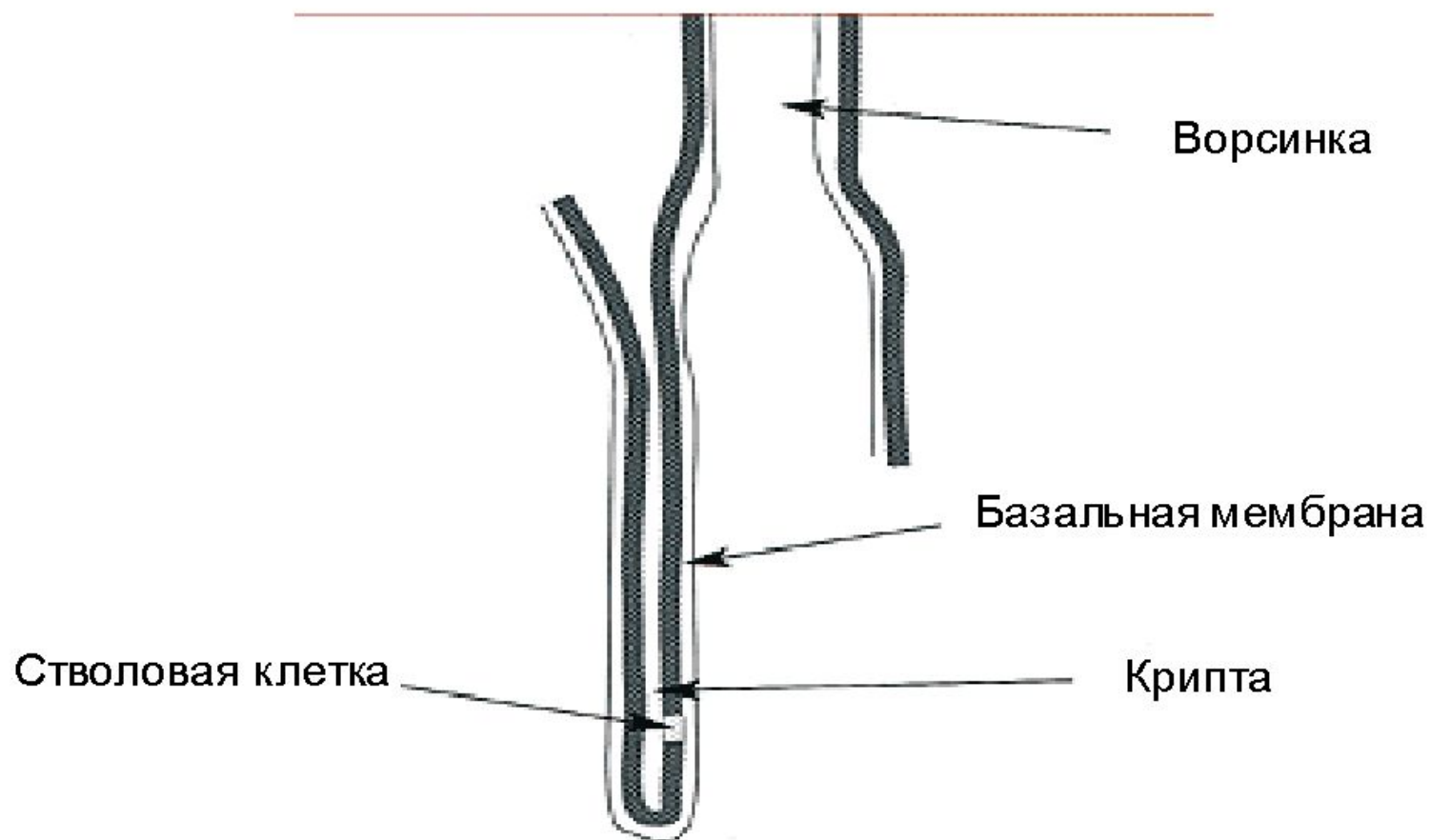
# Характерные свойства «ниши» СК

1. Наличие базальной мембраны.
2. Наличие молекул-сигнализаторов (факторы роста и др.), поступающих из внеклеточного матрикса.
3. Наличие клеток-соседей, которые продуцируют факторы роста и другие типы сигнальных молекул.

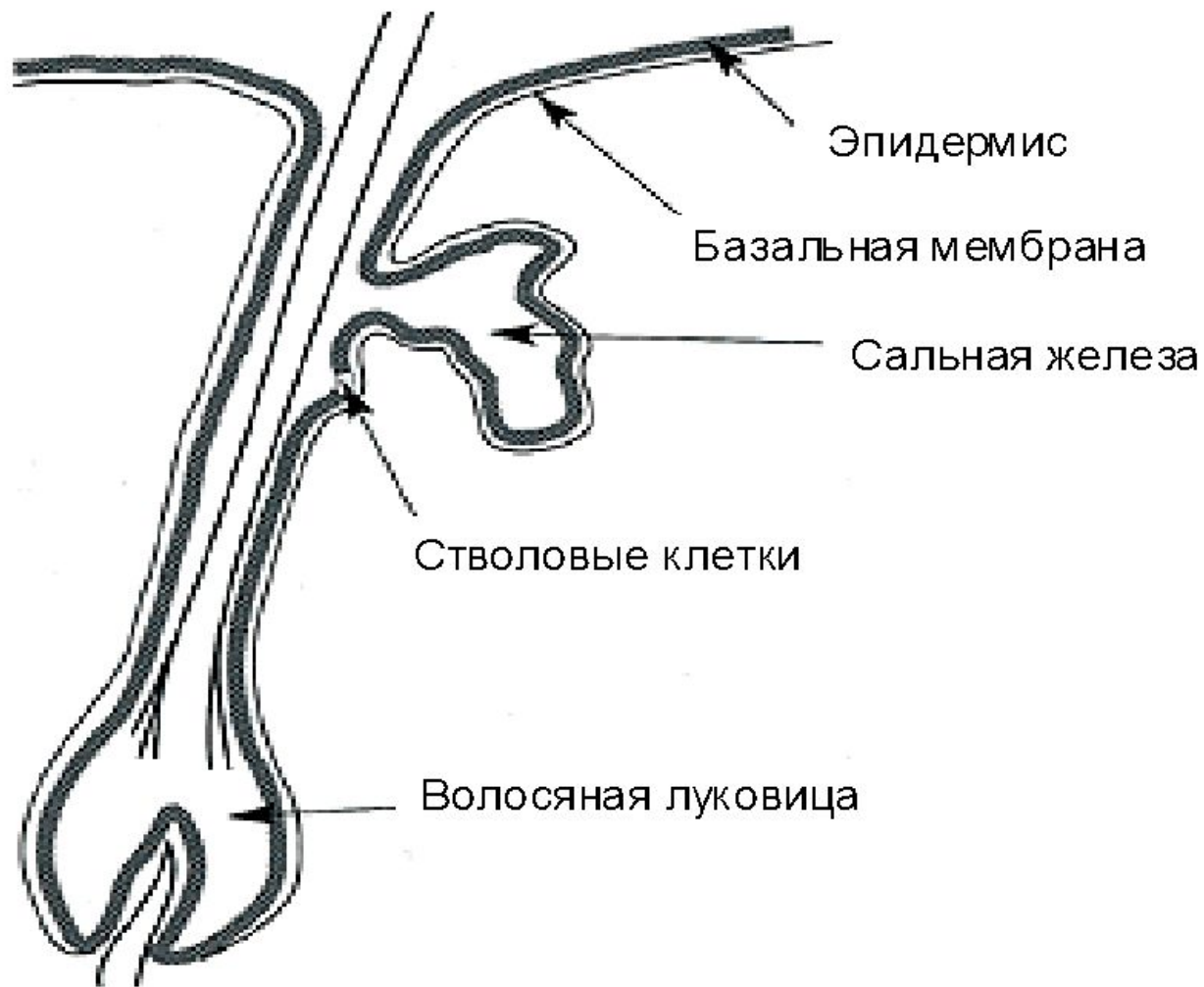
Надежная фиксация СК на базальной мембране в «нише» обеспечивается их адгезией с помощью белков – интегринов.

«Ниша» выполняет защитную функцию – располагается в глубине крист слизитой оболочки, рядом с волосяным фолликулом под сальной железой

## «Ниша» стволовых клеток, крипта тонкого кишечника



## «Ниша» стволовых клеток, волосяной фолликул

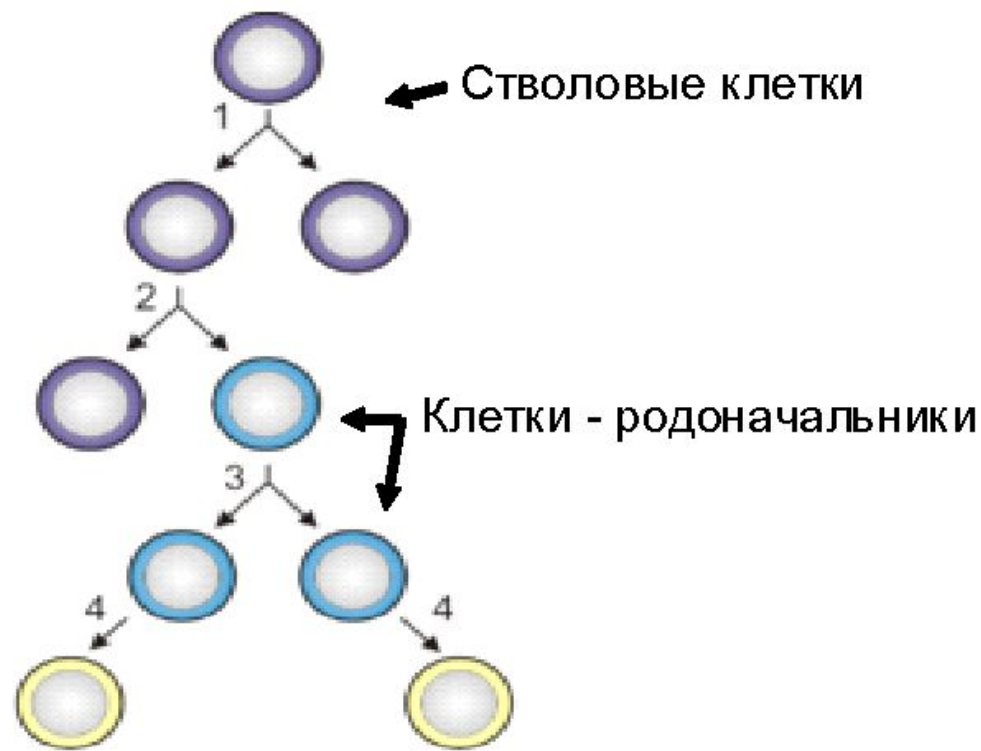


# Типы деления постнатальных СК

- 1. Симметричное деление** – образуется две идентичные СК
- 2. Асимметричное деление** – 1 СК + 1 клетка-родоначальник (progenitor cell).

Клетка-родоначальник – ограничена в потенциале самообновления: как правило, происходит лишь несколько циклов деления, после чего клетки переходят в стадию терминальной дифференциации. В итоге – зрелая, высокодифференцированная клетка определенной ткани.

# Стволовые клетки: деление и дифференциация



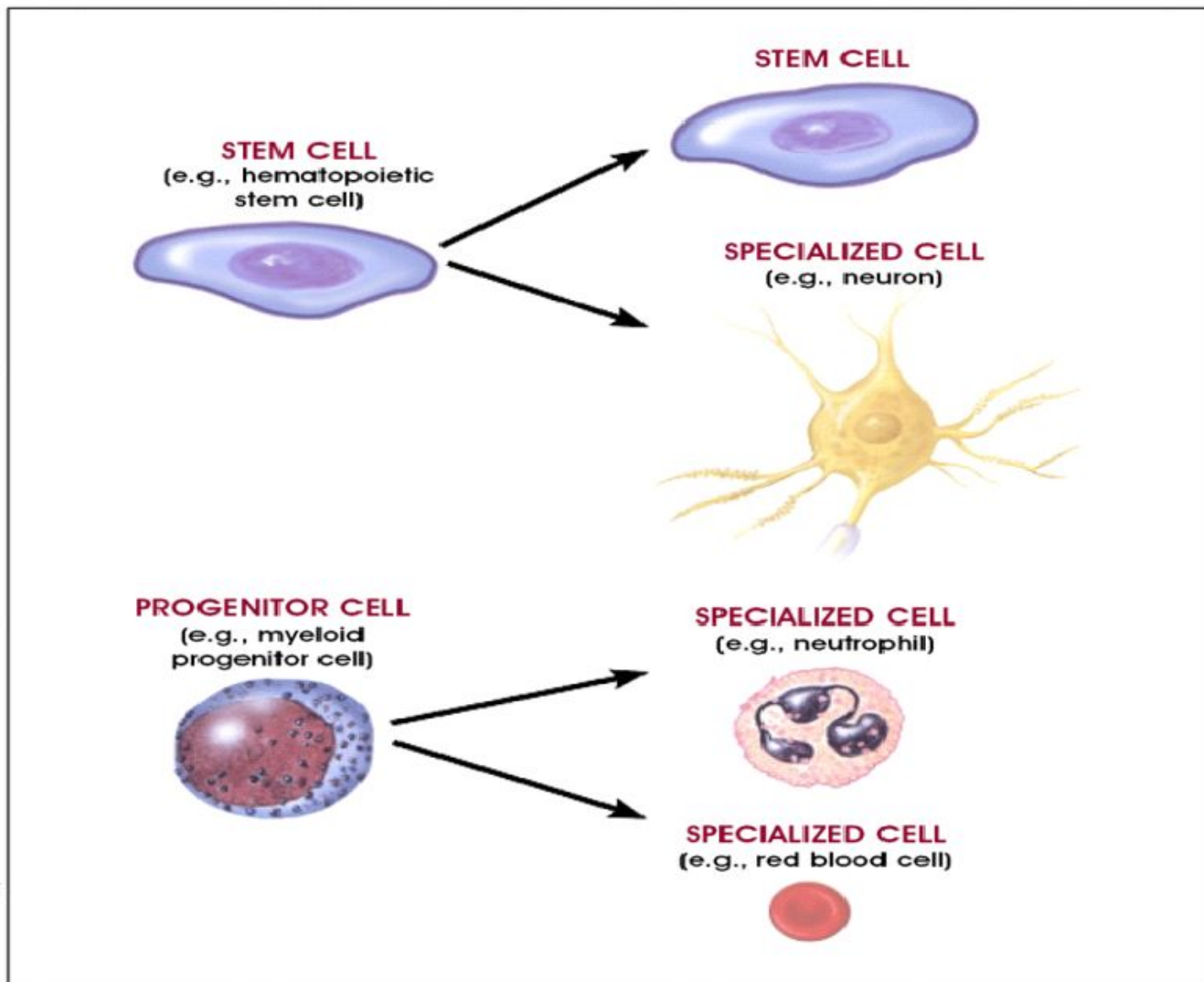
1. Симметричное деление СК

2. Асимметричное деление СК

3. Деление клеток-родоначальников

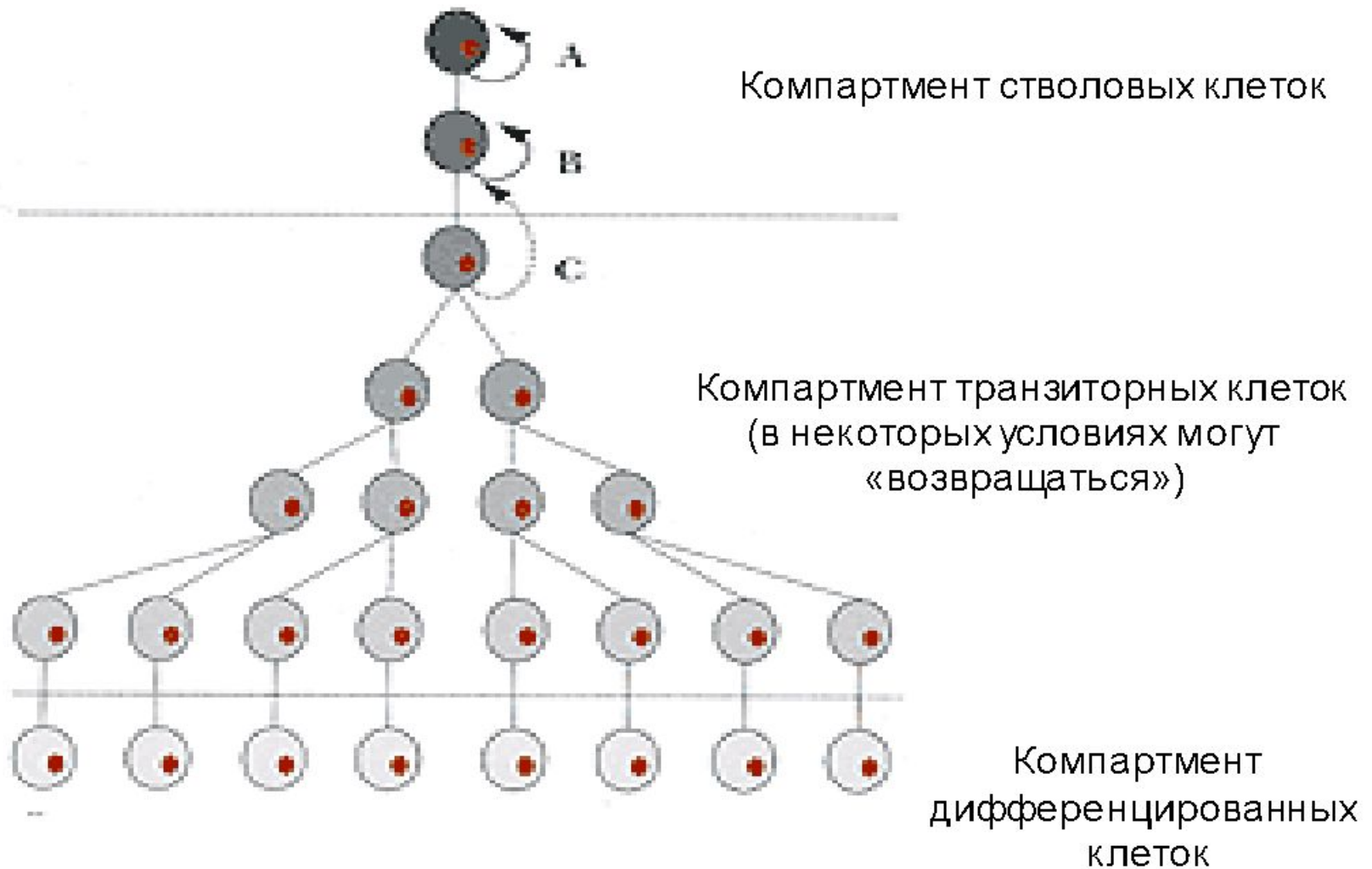
4. Терминальная дифференциация

# Стволовая клетка и клетка-родоначальник: источники всех типов клеток при регенерации





## Компартменты стволовых клеток



# Свойства постнатальных СК

Если ЭСК плюрипотентны, то **постнатальные СК – мультипотентны**, то есть обладают способностью увеличивать число клеток нескольких определенных типов.

Первоначально полагали, что постнатальные СК унипотентны, то есть способны порождать клетки только одного определенного типа. После открытия **мезенхимальных (стромальных) клеток костного мозга**, способных порождать гепатоциты, миоциты, нейроны и др. типы клеток, стала ясна ошибочность этих взглядов.

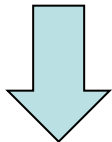
Мультипотентность постнатальных СК называют также **пластичностью**.

В отличии от грызунов, чьи постнатальные СК сравнительно легко выращивать в культуре, постнатальные СК человека имеют ограниченное число делений в культуре и растут плохо.

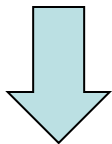
**В настоящее время отсутствуют надежные методы массового выращивания в культуре человеческих постнатальных СК.**

# Клеточная терапия – раздел трансплантационной медицины (клеточно-замещающая терапия)

СК  
(культуры ЭСК и  
постнатальных СК)



Целенаправленная и  
управляемая  
дифференцировка



Пересадка в участки  
дефектов или гибели

**Клеточная терапия** показана для лечения тех заболеваний или патологических процессов, в основе которых лежит утрата/дефект клеток определенного типа.

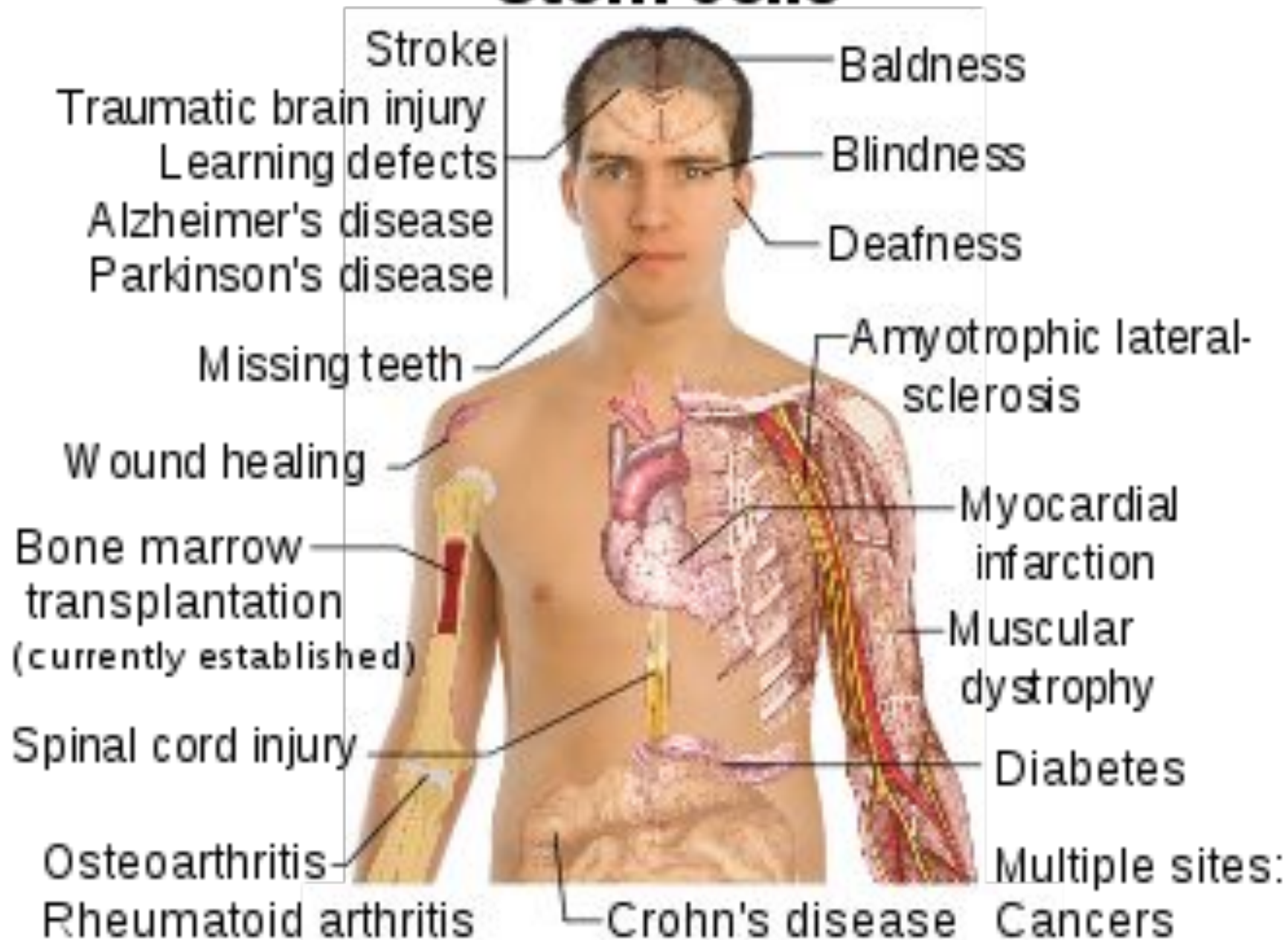
**Клеточная терапия** не эффективна при лечении заболеваний, при которых страдают несколько типов клеток / органов.

**Клеточная терапия** не может обеспечить регенерацию при обширных травмах (дефектах тканей и органов) – тут может потребоваться пересадка органа.

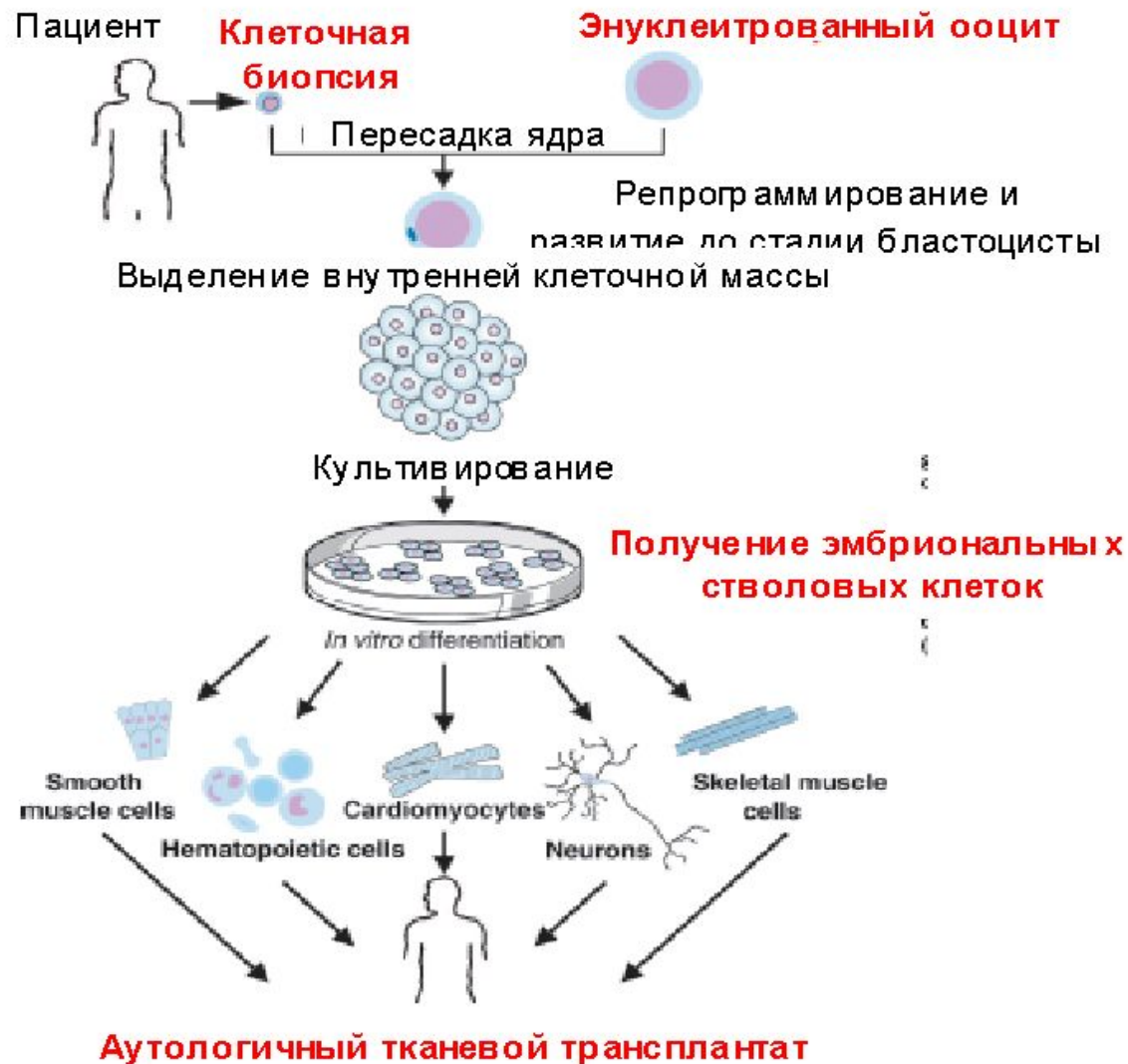
# Некоторые заболевания, для лечения которых показана клеточная терапия (По результатам обследования населения США, 2000 г.)

- Заболевания сердечно-сосудистой системы.....58 млн.
- Аутоиммунные заболевания.....30 млн.
- Диабет I типа.....16 млн.
- Остеопороз.....10 млн.
- Рак.....8,2 млн.
- Болезнь Альцгеймера.....4 млн.
- Болезнь Паркинсона.....1,5 млн.
- Травмы спинного мозга.....0,25 млн.
- Ожоги (некоторые).....0,3 млн.
- Врожденные пороки.....150 тыс. ежегодно

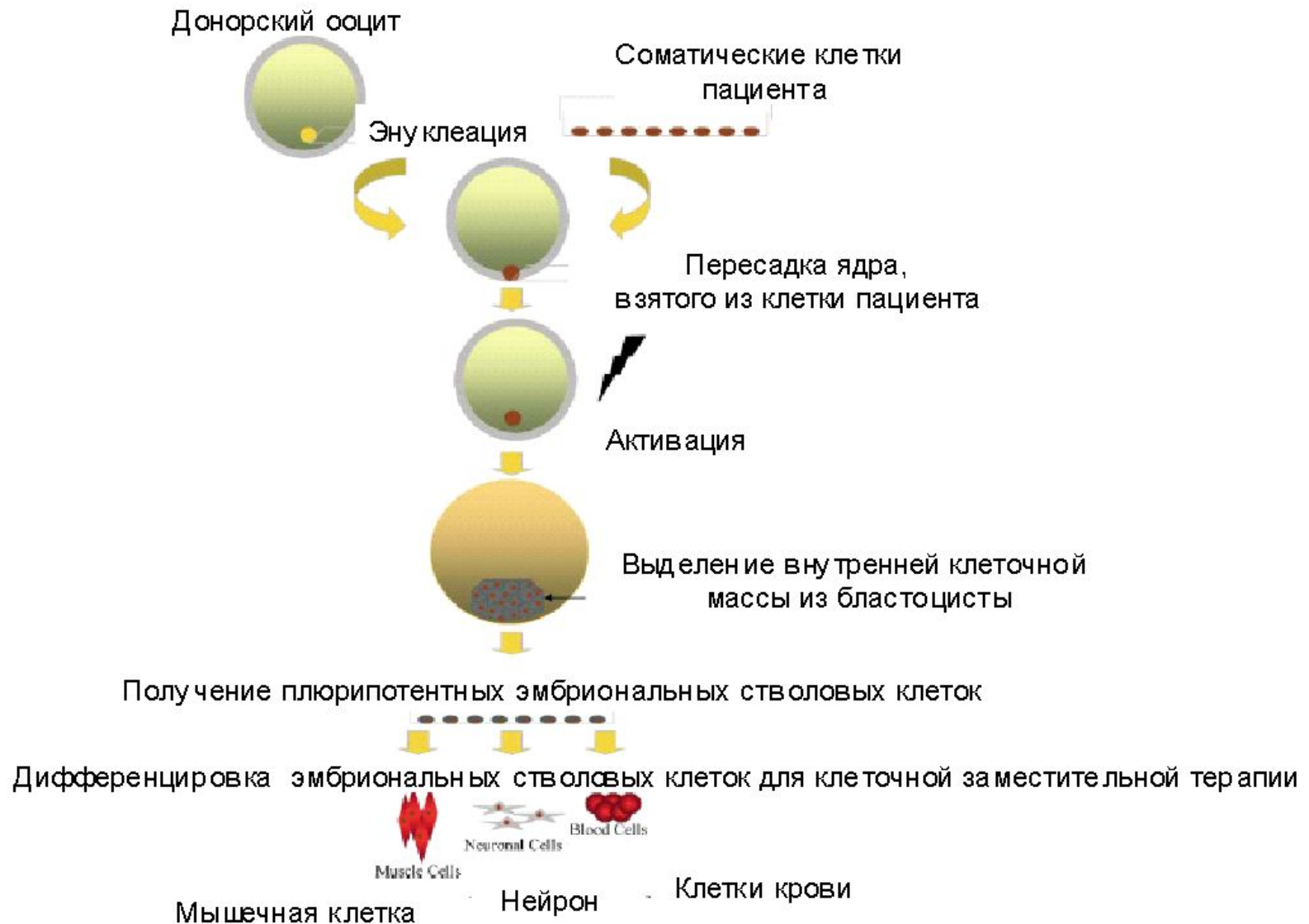
# Potential uses of **Stem cells**



# Стратегия терапевтического клонирования для получения аутологичного тканевого трансплантата



## Этапы терапевтического клонирования



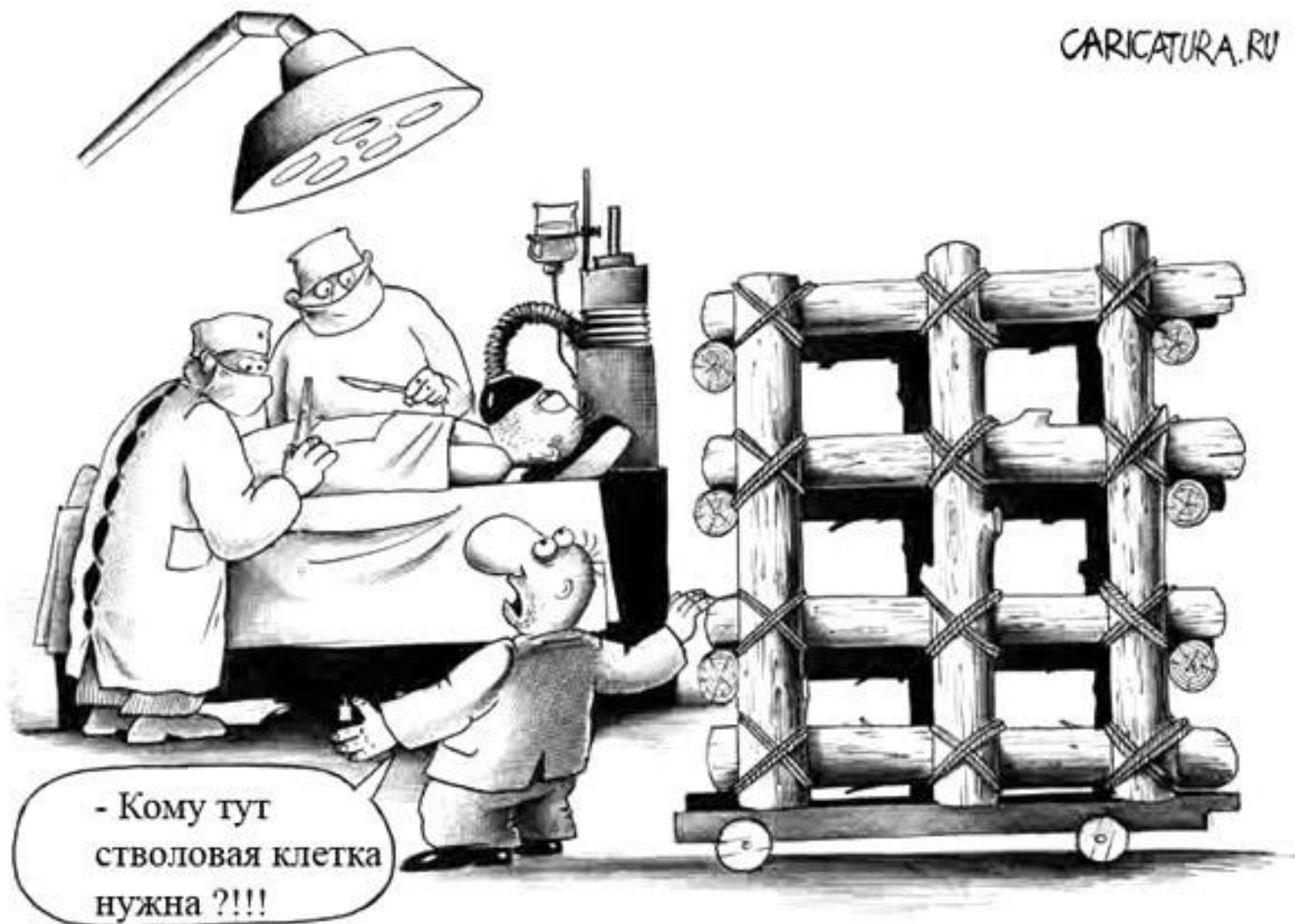


**В настоящее время существует один  
вид полноценной клеточной терапии:  
пересадка костного мозга для  
лечения лейкемии.**

## **Препятствия и проблемы на пути к терапии стволовыми клетками**

- **Отсутствуют линии ЭСК, пригодные для клинического применения**
- **Запрет на использование abortивного материала**
- **Высокий риск инфицирования линий СК вирусами**
- **Запрет на получение новых линий ЭСК**
- **Отсутствуют надежные методы предотвращения спонтанной дифференциации СК в культуре**
- **Отсутствуют надежные методы контроля чистоты полученных линий СК**
- **Высокий риск малигнизации**
- **Высокая вероятность отторжения клеточного трансплантата**
- **Запрет на терапевтическое клонирование**
- **Клинический опыт применения ЭСК (за исключением гемопоэтических и мезенхимальных СК) практически отсутствует**
- **Не изучены отдаленные последствия применения СК**

**В марте 2009 года Б. Обама отменил запрет на исследования с использованием человеческих эмбриональных стволовых клеток, который существовал с 2001 года по инициативе Дж. Буша.**



- Кому тут  
стволовая клетка  
нужна ?!!!