

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В МЕДИЦИНЕ И ИММУНОЛОГИИ

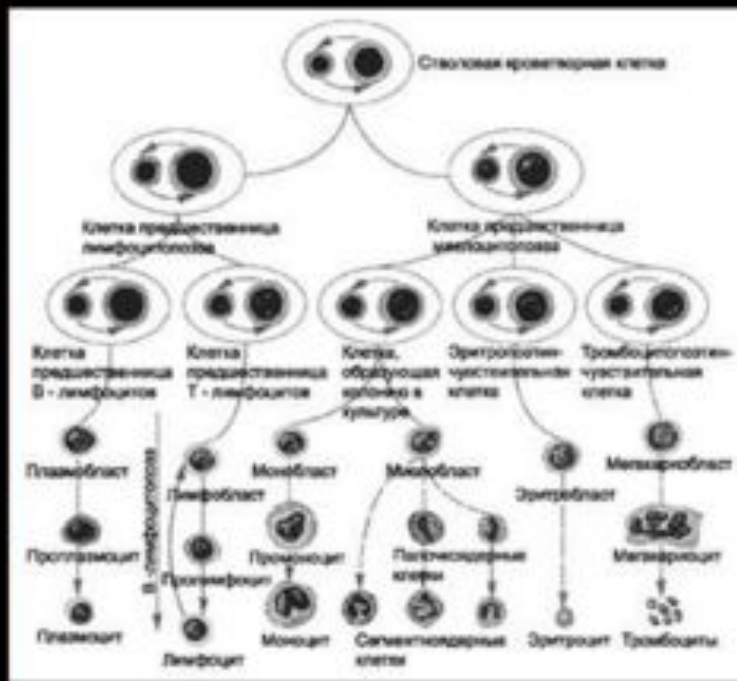
Лекция № 12

Стволовые клетки и их
использование

Самые важные события в биологии XX века



1. Открытие двойной спирали ДНК (1953)
 2. Расшифровка генома человека (2001)
 3. Выделение эмбриональных стволовых клеток человека (1998)
-

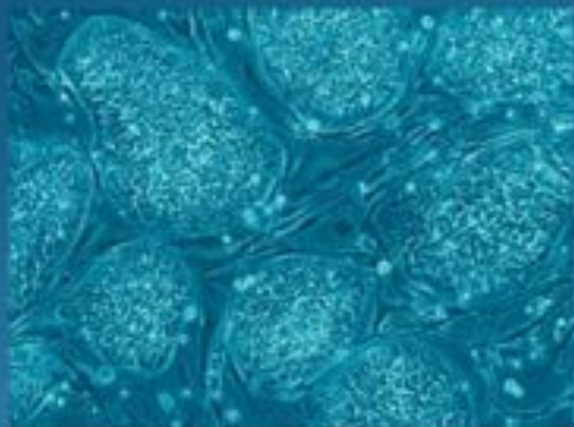


- Клетки крови постоянно разрушаются и появляются вновь.
- В крови взрослого человека ежедневно образуется и погибает около 200 млрд. эритроцитов.
- А.А. Максимов в начале XX века предположил, что в кроветворных тканях должны существовать стволовые (недифференцированные) клетки эритроцитов.

- Термин «стволовая клетка» был введён в научный обиход русским гистологом, профессором Военно-медицинской академии Санкт-Петербурга Александром Максимовым (1874—1928). Он постулировал существование стволовой кроветворной клетки излагая в 1909 году свое открытие на заседании гематологического общества в Лейпциге. Именно Максимов А. назвал клетку-прародительницу всех клеток крови *Stamzelle*, то есть стволовой.
- В 1981 году американский биолог Мартин Эванс впервые выделил недифференцированные плюрипотентные линии стволовых клеток — бластоцисты мыши.
- Эмбриональные стволовые клетки первыми выделили западные ученые Д. Томпсон и Д. Герхарт в 1998 году



Что такое стволовые клетки?



Эмбриональные стволовые клетки человека под микроскопом.

Стволовые клетки - недифференцированные (незрелые) клетки, имеющиеся во всех многоклеточных организмах. Стволовые клетки способны самообновляться, образуя новые стволовые клетки, делиться посредством митоза и дифференцироваться в специализированные клетки, то есть превращаться в клетки различных органов и тканей.

Нишами стволовых клеток называются места в ткани, где постоянно залегают стволовые клетки, делящиеся по мере надобности для дальнейшей дифференциации.

Стволовые клетки размножаются путём деления, как и все остальные клетки. Отличие стволовых клеток состоит в том, что они могут делиться неограниченно, а зрелые клетки обычно имеют ограниченное количество циклов деления

Особенность стволовых клеток заключается в том, что при их делении одна из дочерних клеток дифференцируется, а вторая остается стволовой. За счет этого стволовые клетки образуют самоподдерживающуюся популяцию.

В различных органах и тканях взрослого организма существуют частично созревшие стволовые клетки, готовые быстро дозреть и превратиться в клетки нужного типа. Они называются бластными клетками. Например, частично созревшие клетки мозга — это **нейробласты**, кости — **остеобласты** и так далее. Дифференцировку могут запускать как внутренние причины, так и внешние. Любая клетка реагирует на внешние раздражители, в том числе и на специальные **сигналы цитокины**. Например, есть сигнал (вещество), служащий признаком перенаселённости. Если клеток становится очень много, то этот сигнал сдерживает деление. В ответ на сигналы клетка может регулировать экспрессию генов

Получение стволовых клеток:

- Один из основных источников получения стволовых клеток в настоящее время - эмбриональные ткани. Эмбриональные стволовые клетки получают используя: абортивный материал; эмбрионы - продукты клонирования; эмбрионы, специально полученные для выделения стволовых клеток, путем смешивания яйцеклеток и спермы.
- Разработаны различные методы выделения и обогащения кроветворных стволовых клеток из периферической крови, костного мозга и пуповинной крови, являющейся наиболее перспективным источником получения кроветворных стволовых клеток.
- Выделяют стволовые клетки животных, чаще всего акулы и черной овцы.

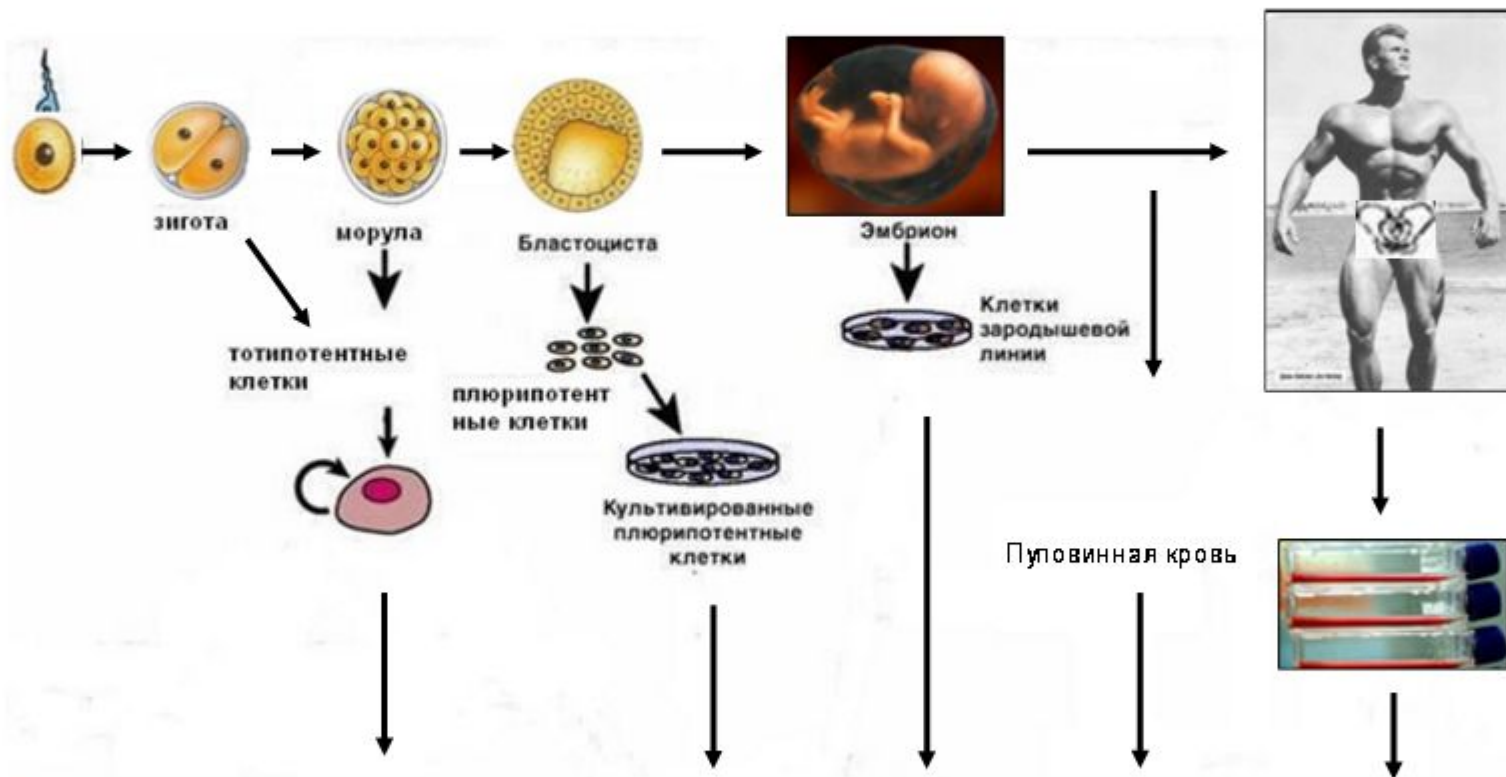
Различают несколько типов стволовых клеток:

- это эмбриональные и взрослые (от взрослого организма) стволовые клетки.
- Гемопозитические стволовые клетки участвуют в гемопозе и происходят из костного мозга.
- Мезенхимальные стволовые клетки ведут свое происхождение от зародышевого листка мезенхимы.
- Стромальные стволовые клетки содержатся в строме костного мозга.
- Существуют еще тканевые стволовые клетки, содержащиеся в различных тканях.

Характеристики эмбриональных стволовых клеток:

- **Тотипотентность** — способность образовывать любую из примерно 350 типов клеток организма (у млекопитающих);
- **хоуминг** — способность стволовых клеток, при введении их в организм, находить зону повреждения и фиксироваться там, исполняя утраченную функцию;
- факторы, которые определяют уникальность стволовых клеток, находятся не в **ядре**, а в **цитоплазме**. Это избыток **мРНК** всех 3 тысяч **генов**, которые отвечают за раннее развитие **зародыша**;
- **теломеразная** активность. При каждой репликации часть **теломер** утрачивается (статья **лимит Хейфлика**). В стволовых, половых и опухолевых клетках есть теломеразная активность, концы их **хромосом** надстраиваются, то есть эти клетки способны проходить потенциально бесконечное количество **клеточных делений**, они бессмертны.

ИСТОЧНИКИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК



направленная дифференцировка и клеточная терапия



кожа



хондроциты



сердце



поджелудочная железа



линза



нейрон



кровь



мышца



цистоэпидиальная железа

ПРОЦЕССИНГ



Источники стволовых кроветворных клеток

Источники
стволовых клеток
в организме
человека

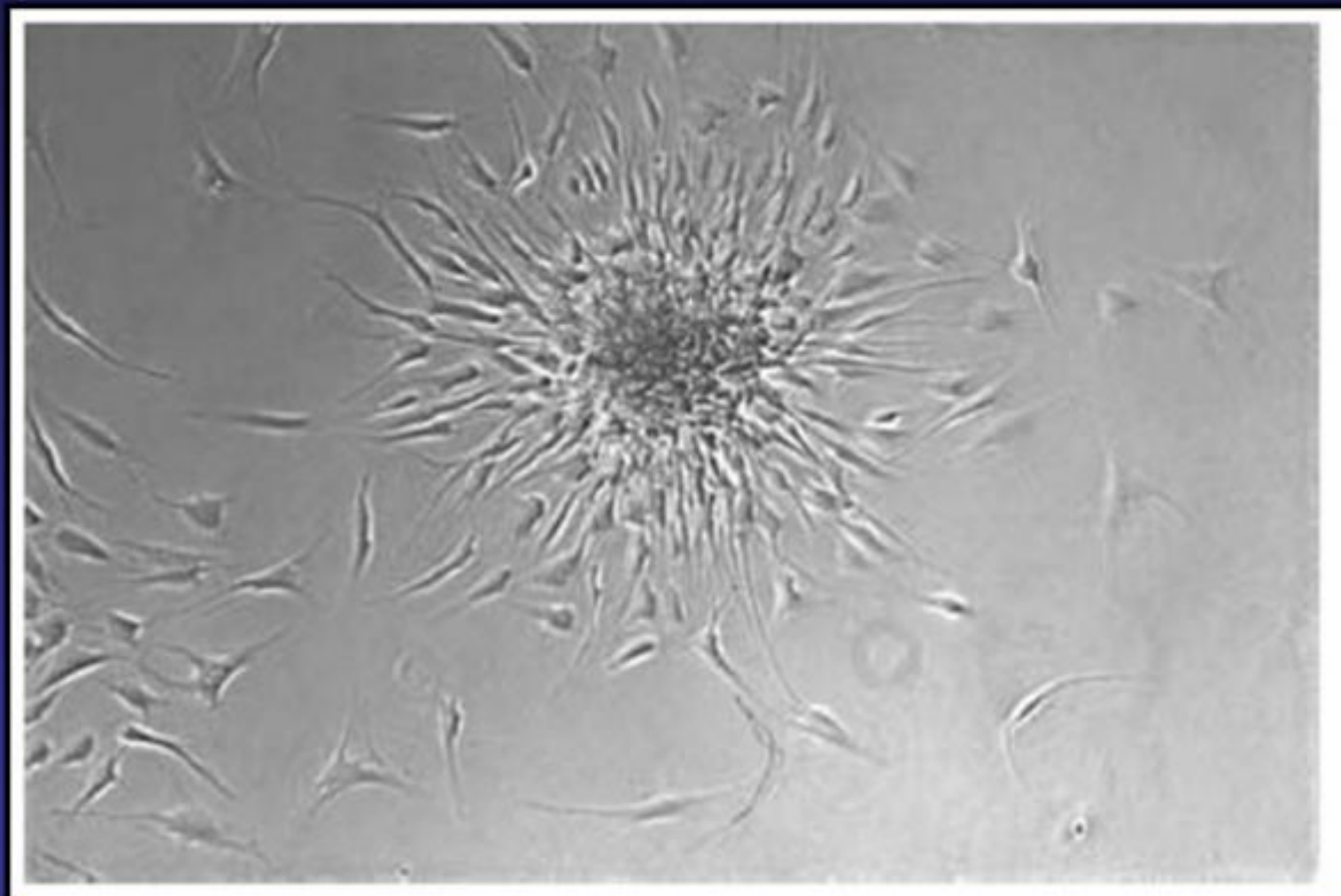


Костный мозг

Периферическая
кровь

Плацентарная и
пуповинная кровь

Взрослые стволовые клетки



Рост колонии мезенхимальных стволовых клеток
костного мозга в культуре

Количество стволовых клеток в организме:

у эмбриона — 1 клетка на 10 тысяч



у человека в 60-80 лет — 1 клетка на 5-8 миллионов

Чем моложе организм, тем больше запас стволовых клеток, и, соответственно, восстановительный потенциал.

Почему мезенхимальные стволовые клетки ?

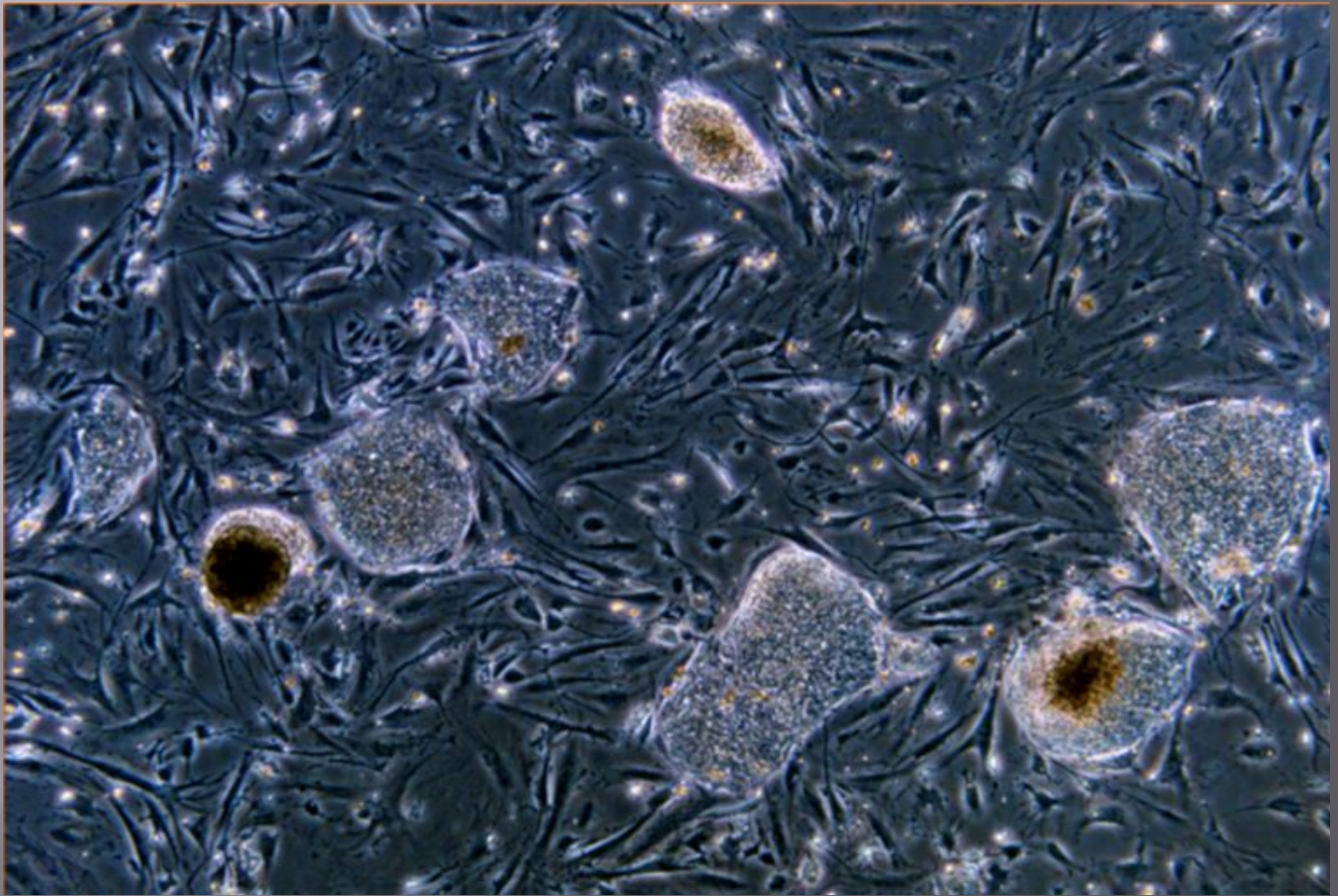
(+) / (-)	Эмбриональные стволовые клетки	Взрослые стволовые клетки костного мозга
Преимущества	<ul style="list-style-type: none"> • Неограниченная способность к пролиферации • тотипотентность • Оптимальны для создания банков 	<ul style="list-style-type: none"> • Высокая пролиферативная активность • Мульти- и плюрипотентность • Легкость получения • Отсутствие этических проблем • Отсутствие необходимости иммуносупрессии (аутотрансплантация)
недостатки	<ul style="list-style-type: none"> • Этические проблемы (статус эмбриона...) • Трудно выделить чистую линию • Риск отторжения • Риск канцерогенеза • Маркеры специфической дифференцировки плохо исследованы • Дифференцировка <i>in vitro</i> плохо регулируется 	<ul style="list-style-type: none"> • Маркеры специфической дифференцировки плохо исследованы • Их количество резко уменьшается с возрастом • Ограниченное использование при острой патологии и создания банков

Свойства эмбриональных СК

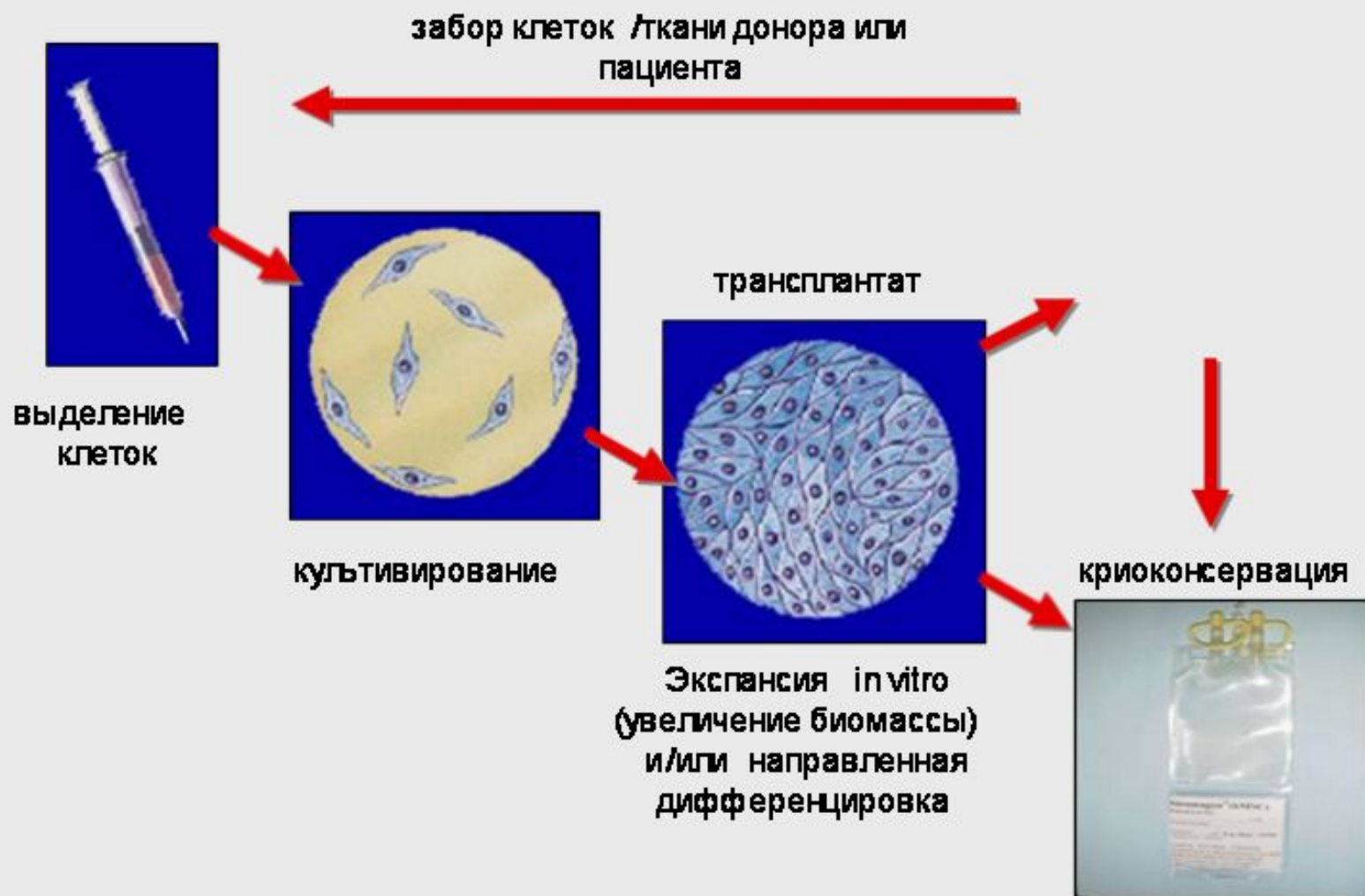
- Нет специализации (недифференцированы) – минимальный фенотип
- Неограниченный потенциал пролиферации
- Тотипотентность
- Стабильный диплоидный (нормальный) кариотип
- Постоянный высокий уровень экспрессии теломеразы (бессмертность)
- При трансплантации: образуют тератомы, химеризуют зародыш
- Экспрессия генов раннего эмбриогенеза

Проблема использования стволовых клеток:

- эмбриональные стволовые клетки способны превратиться во что угодно (если бластоцисту, из которой их выделили, имплантировали бы в матку, где из них развились бы все ткани нового организма);
- эмбриональные стволовые клетки склонны к неограниченному делению и очень плохо понимают химические «команды» взрослого организма — поскольку в бластоцисте такие «команды» некому подавать;
- введенные в организм клетки могут дать начало злокачественным опухолям или тератомам — уродливым разрастаниям различных тканей в совершенно неподходящем для них месте;
- проблема при использовании стволовых клеток для трансплантации - их иммунологическая совместимость с тканями реципиента;
- возникают этические проблемы использования стволовых клеток .



Типичная схема клеточной терапии





Клеточная терапия - это направление медицинской науки, которое может стать основой для лечения наиболее распространенных заболеваний сердечно-сосудистой и центральной нервной системы, опорно-двигательного аппарата, печени, других органов.

Специалистами в области клеточных технологий созданы современные методики и соответствующие устройства по получению стволовых клеток не только из ткани костного мозга, но и из периферической крови, плаценты, пуповинной крови. Клиническая практика показывает высокую лечебную эффективность их использования в различных профилях практической медицины (сердечно-сосудистые заболевания, болезни печени, органов пищеварения, кроветворной системы, опорно-двигательного аппарата, нервной системы, психической сферы, почек, мужской и женской половой сферы и др.)



Технология обработки пуповинной крови

1. Забор пуповинной/плацентарной крови

Кровь из пуповины и плаценты самотеком поступает в контейнер с антикоагулянтом – специальным веществом, препятствующим свертыванию крови.

2. Тестирование крови на стерильность и типирование.

Типирование – анализ клеточного состава пуповинной крови

3. Выделение стволовых клеток

- вводят специальные реагенты для осаднения эритроцитов.

- фракцию, содержащую гемопоэтические стволовые клетки, при помощи плазмоэкстрактора **отделяют от эритроцитарного осадка.**

- пакет с клеточной массой **центрифугируют** для отделения излишков плазмы

- к клеточной массе **добавляют криопротекторы**, которые защищают клетки от гибели при замораживании.



4. Расфасовка стволовых клеток

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).

Применение стволовых клеток.

- Сообщения об эффектах применения стволовых клеток при различных заболеваниях, появляющиеся в последние годы в самых солидных научных журналах, чаще всего рекламные материалы коммерческих клиник
- Чаще всего истории недостоверны и описанных в них исцелений не было
- Есть только группа заболеваний, для которых уже сегодня пересадка стволовых клеток (своих или донорских) — не только стандартный, но основной или даже единственный действенный метод лечения
- Во всех прочих областях медицины результатов их применения, подтвержденных рандомизированными (случайными) многоцентровыми клиническими испытаниями отсутствуют .

Стволовые клетки применяются:

- при лечении лучевой болезни;
- при лейкозе — когда кроветворная ткань пациента уничтожается намеренно, поскольку ее клетки встали на путь злокачественного перерождения (эта парадоксальная форма рака, при которой собственно опухоль отсутствует вовсе);
- при аутоиммунных заболеваниях (в частности, рассеянном склерозе, ревматоидном артрите и волчанке);
- при устранении последствий очень жестких форм противоопухолевой химиотерапии;
- при заболеваниях, вызванных самопроизвольно возникающим дефицитом стволовых клеток во всем организме либо в каком-то конкретном органе или ткани (например, системный остеопороз).

Перспективы применения клеточных технологий:

- 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).

Банки стволовых клеток.

- Стволовые клетки хранятся в специальных и банках - собственных или донорских.
- Самый крупный Vita Bank находится в Лейпциге, ему уже 34 года. Забор клеток стоит здесь 1900 евро.
- В России тоже есть банки стволовых клеток. Забор клеток стоит \$1500, годовой абонемент на хранение - \$100.



Хранение

Концентрат плавно замораживают до -90°C и помещают на карантинное хранение (пары жидкого азота, -150°C), где они находятся до того момента, пока не будут готовы результаты всех анализов.

Приблизительно через 20 дней образцы переносят в постоянное хранилище (жидкий азот, -196°C)



Исследования показывают, что в таком состоянии клетки не теряют своих свойств 15-17 лет. Теоретически замороженные клетки могут храниться бесконечно долго.

Органы и ткани, которые ученые смогли вырастить с помощью стволовых клеток

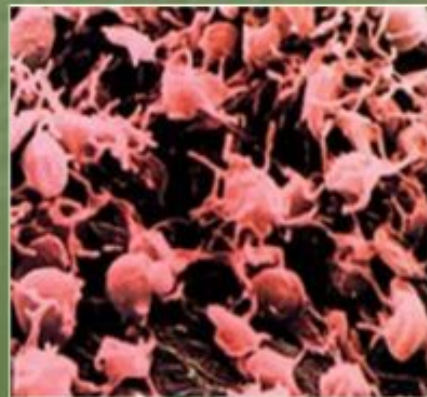
В 2007 году стволовые клетки помогли британским ученым создать часть сердца человека

В 2007 году японские ученые вырастили из стволовых клеток роговицу глаза

В 2007 году японские ученые вырастили зуб из стволовых клеток

В 2008 году японские ученые создали тромбоциты из стволовых клеток

В 2008 году американские ученые смогли вырастить новое сердце на каркасе от старого



Статистика



Вероятность того,
что кровь подойдёт,
%

- Родным братьям, сёстрам
- Родителям, бабушкам, дедушкам

Интересен и другой подсчёт, который провели специалисты. Оказывается, в жизни реальный случай использовать кровяную «страховку» до двадцатилетнего возраста представится в 4 случаях из 10 000, иными словами, с вероятностью в 0,04%. А до 70 лет, то есть за всю жизнь, эта вероятность повысится до 0,22%.

Главная трудность состоит в том, что такой крови слишком мало. Считается, что лучшая доза для получения лечебного эффекта – 40 млн. ядросодержащих клеток на 1 кг массы человека. Минимально достаточными считаются 15–20 млн. клеток на килограмм, так что обычно сдаваемой дозы в 80 мл едва хватает на пациента **весом в 40 кг** – на двенадцатилетнего ребёнка.

Проблему можно решить, искусственно культивируя стволовые клетки в лаборатории, но опыты показывают, что это пока процесс неконтролируемый, и он даже может привести к перерождению клетки в раковую.



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!