

Лекция 2.

Медицинская эмбриология.

Понятие о стволовой клетке.

Иерархия, классификация

СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК.

Эмбриональные и фетальные

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ.

Преподаватель кафедры МиОП к.м.н. Шафигуллина А.К.

3 - Дробление

Стадия 2-х клеток

Стадия 4-х клеток

Стадия 8 клеток

2 - Оплодотворение

Ядро сперматозоида

Ядро яйцеклетки

1 - Овуляция

яйцеклетка

4 - Морула

5 - Ранняя бластоциста

Внутренняя клеточная масса

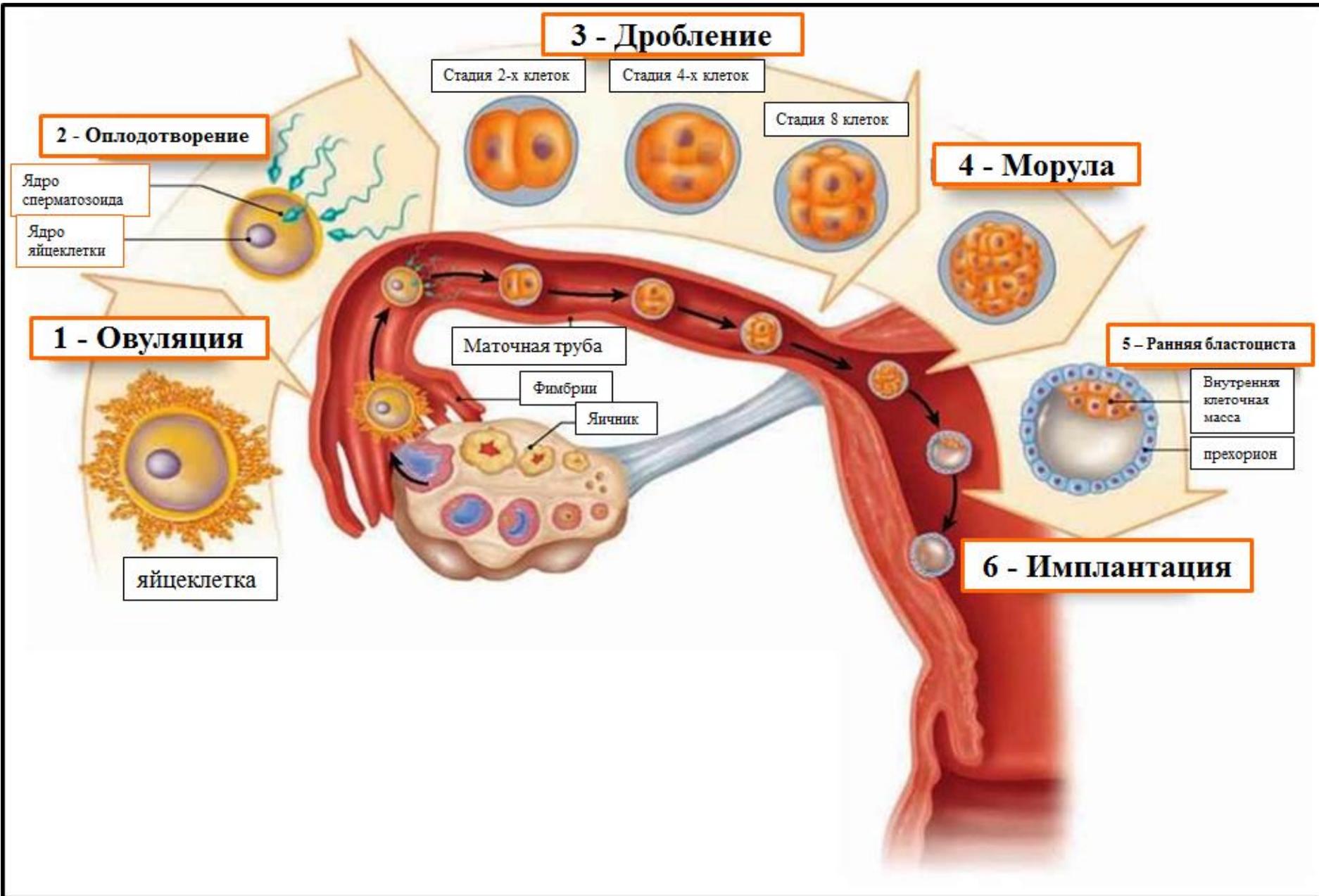
прехорион

6 - Имплантация

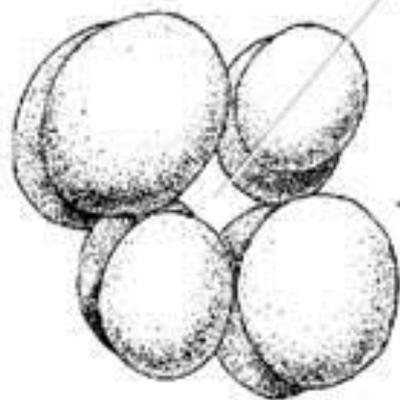
Маточная труба

Фимбрии

Яичник

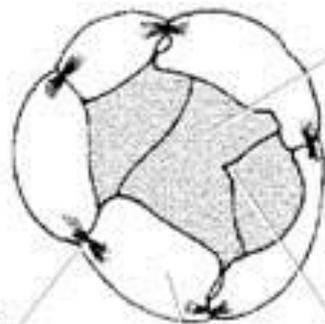


**Ранняя
8-клеточная стадия**



Большие
межклеточные
пространства

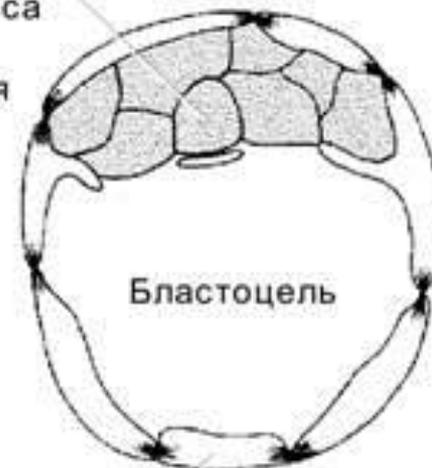
Морула



Плотный
контакт

Наружная
клетка

Бластоциста



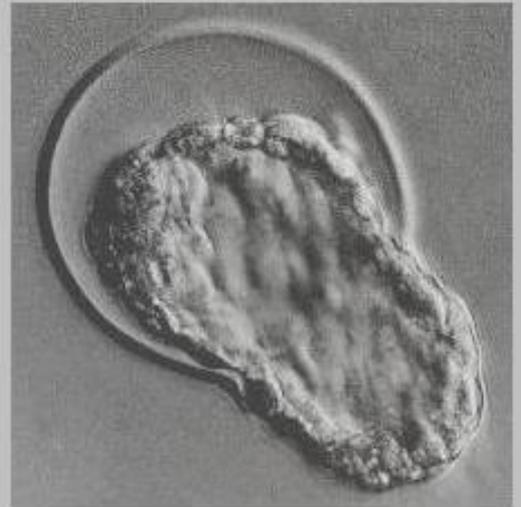
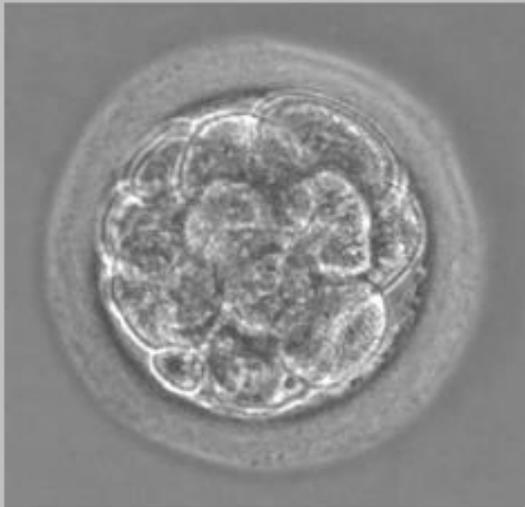
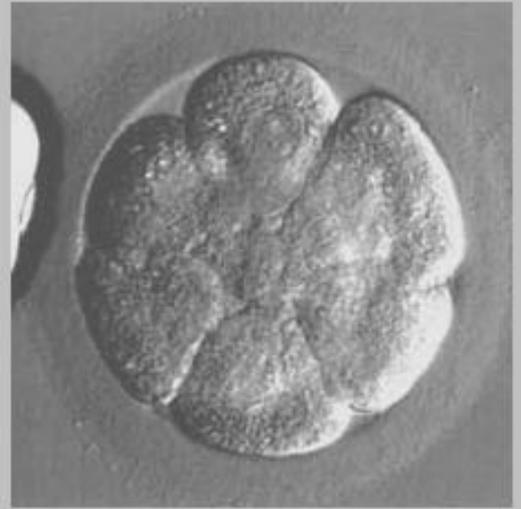
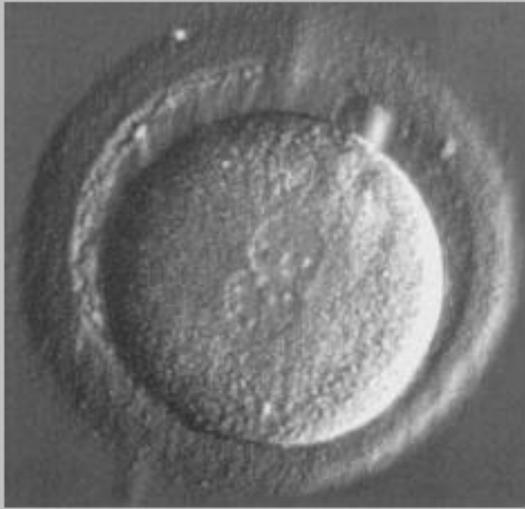
Внутренняя
клеточная
масса

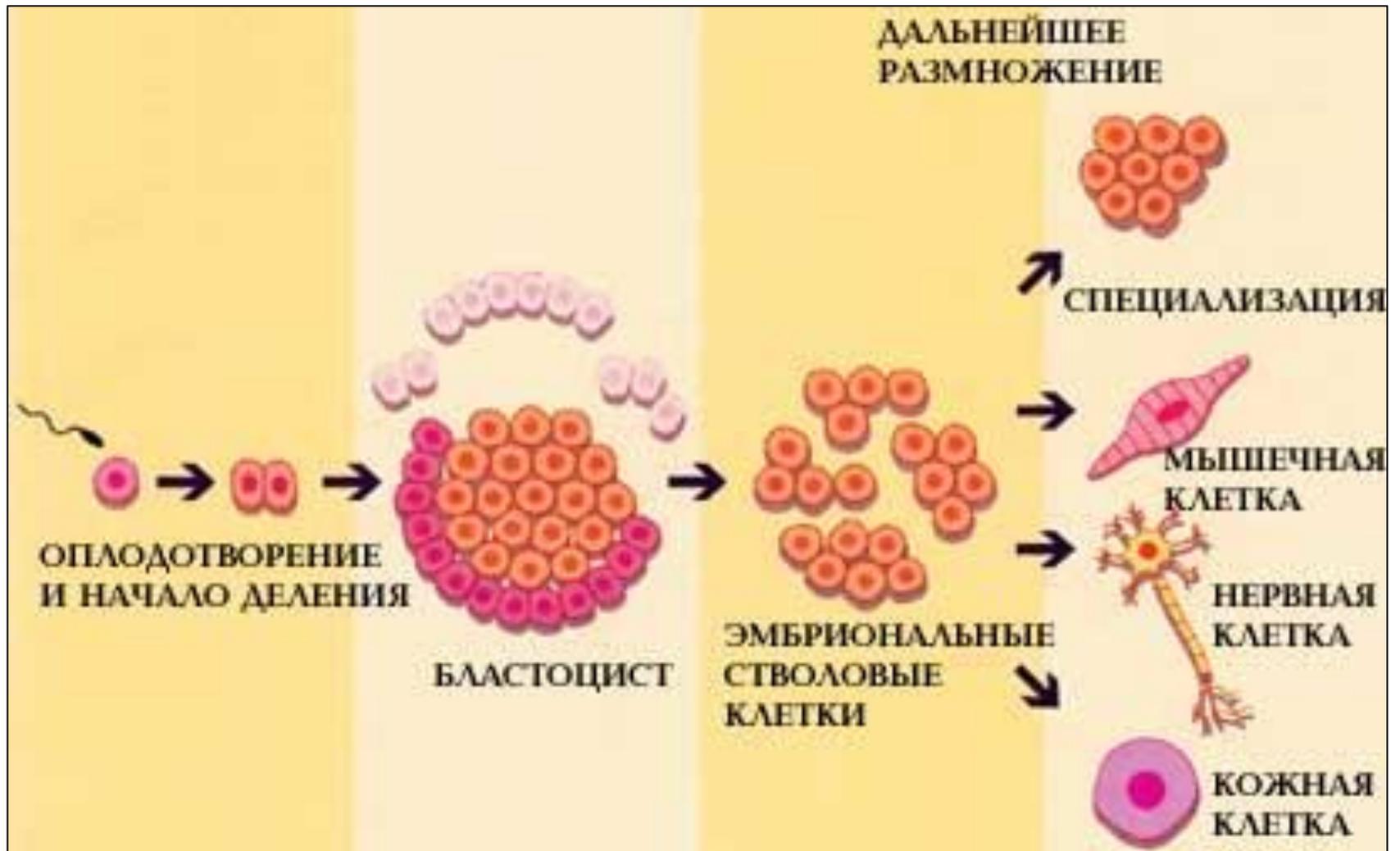
Внутренняя
клетка

Бластоцель

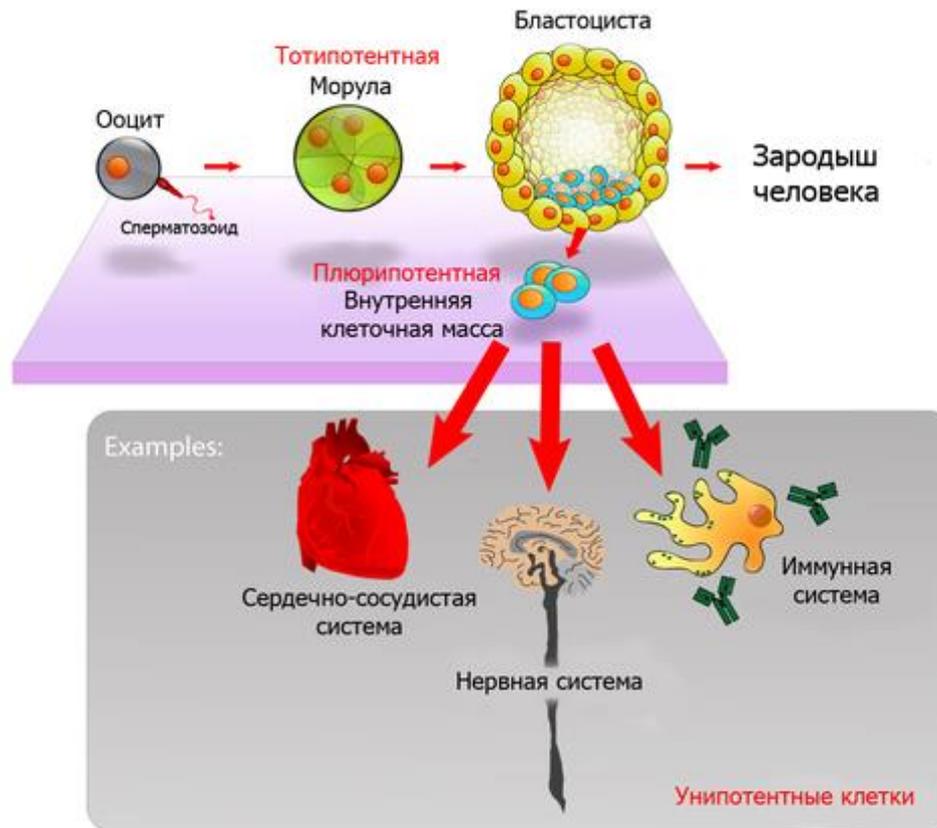
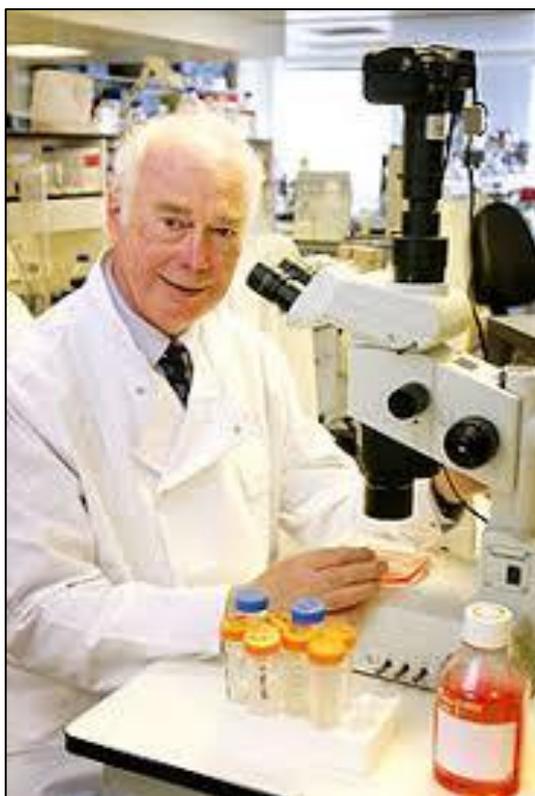
Щелевой
контакт

Клетка трофобласта





Внутренняя клеточная масса бластоциста – эмбриональные стволовые клетки

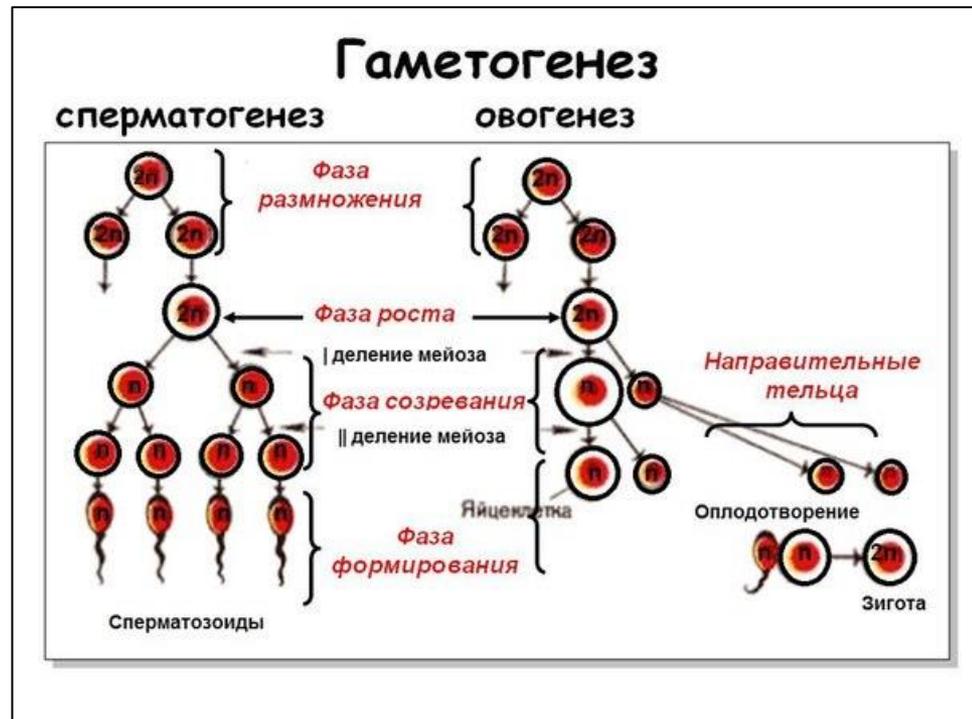
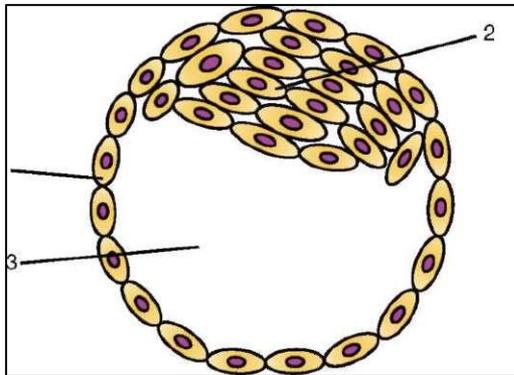


Эмбриональные стволовые клетки выделили из мышиных эмбрионов в 1981 году Мартин Эванс (лауреатом Нобелевской премии по физиологии и медицине 2008 года) и Мэтью Кауфман, а также независимо от них Гэйл Мартин.

В ноябре 1998 года в группе Джеймса Томсона в Университете Висконсина ученые выделили такие клетки из бластоцисты человека.

Типы ЭСК:

- 1) Выделенные из внутренней клеточной массы
- 2) Клетки эмбриональных карцином (тератокарцином) – смесь дифференцированных клеток различных зародышевых слоев и недифференцированных стволовых клеток
- 3) Первичные половые клетки зародыша – гонциты (эмбриональная клетка, из которой впоследствии могут образоваться сперматозоиды или яйцеклетки)



Внешние признаки ЭСК:

- Наличие крупного ядра, содержащее преимущественно эухроматин и несколько ядрышек
- Высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение – цитоплазма представлена узким ободком, окружающим ядро
- Высокая активность щелочной фосфатазы – один из общепринятых тестов на сохранение плюрипотентности клеток
- Высокий уровень теломеразной активности

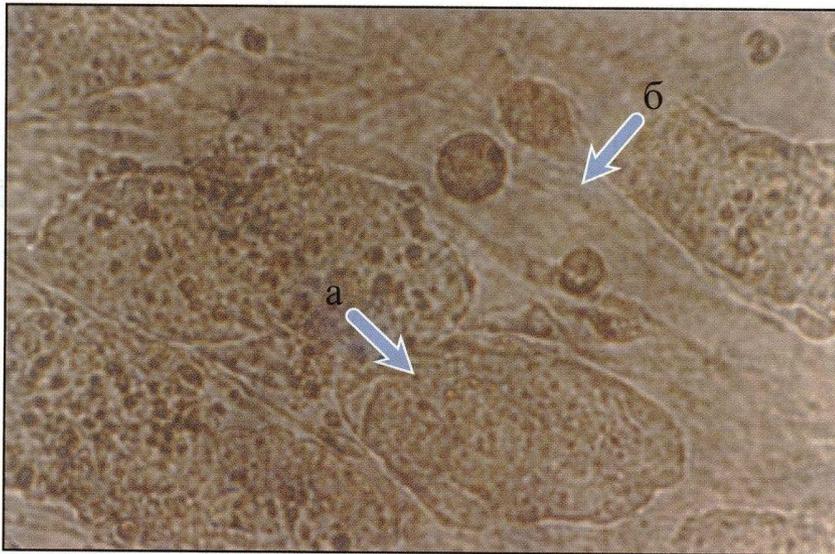


Рис. 7.1. Колонии ЭС клеток мыши на фидерном слое из эмбриональных фибробластов мыши ($\times 400$):

а — колонии, сформированные ЭС клетками; б — клетки фидерного слоя.

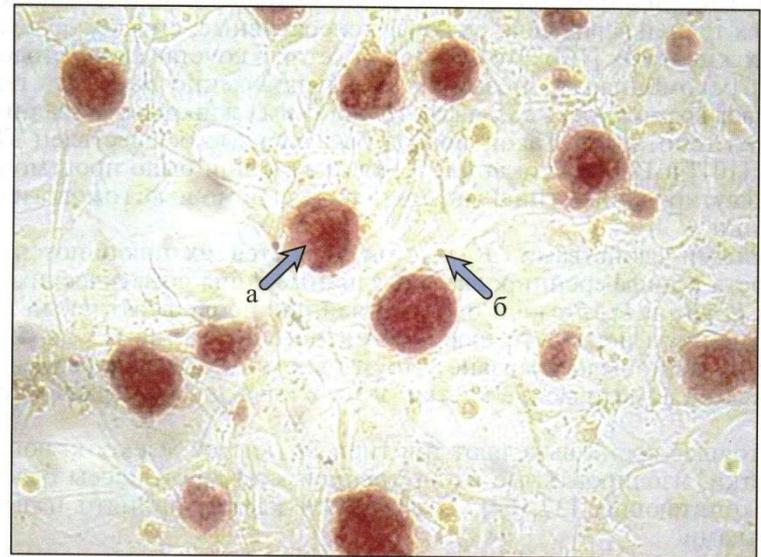
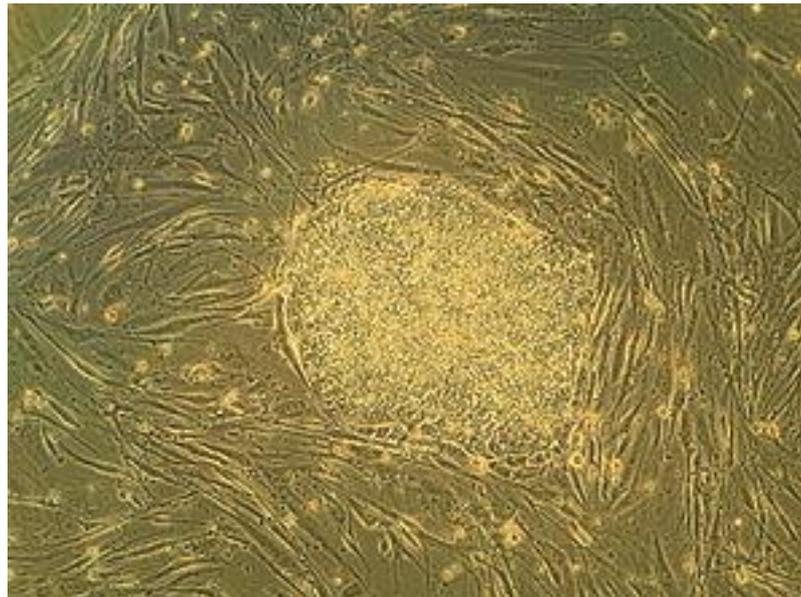


Рис. 7.2. Выявление активности щелочной фосфатазы в культурах ЭС клеток мыши, растущих на фидерном слое из эмбриональных фибробластов мыши ($\times 200$).

а — окрашенные колонии, сформированные ЭС клетками; б — неокрашенные клетки фидерного слоя.

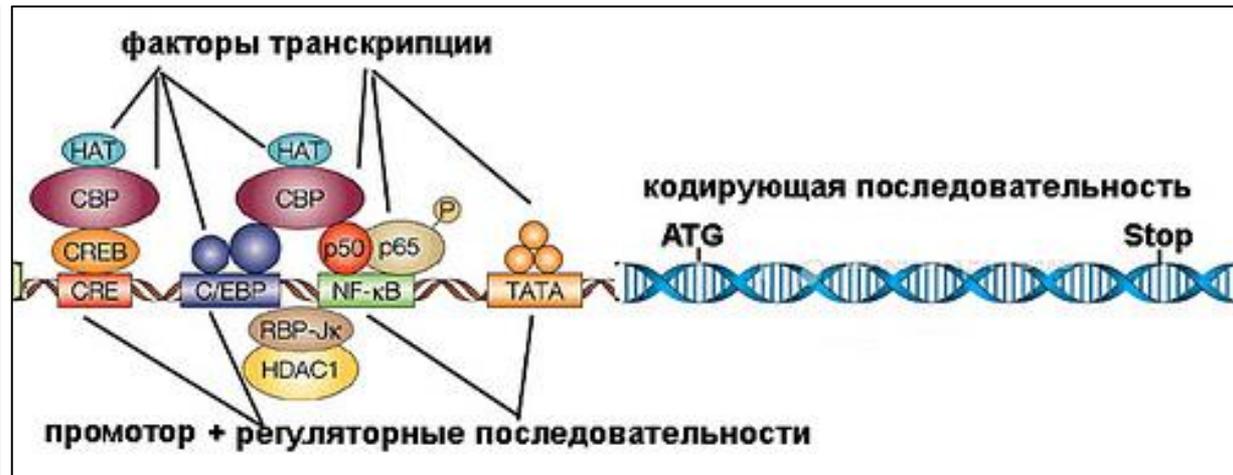
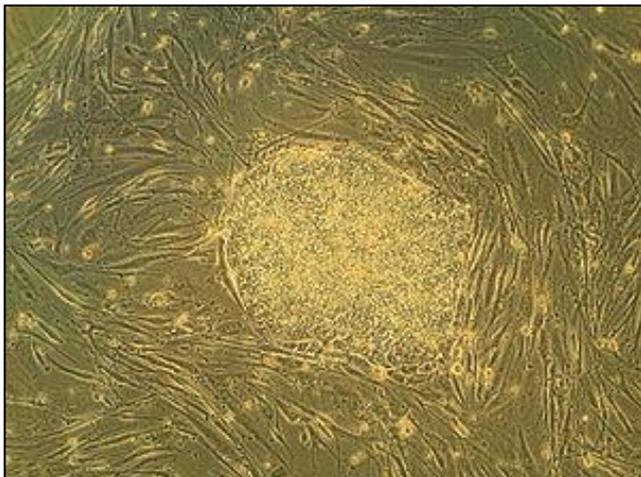
Свойства ЭСК

1. **Плюрипотентность** - способность к дифференцировке в различные типы соматических клеток в условиях *in vitro* и *in vivo*
2. Неограниченный пролиферативный потенциал с сохранением исходного плюрипотентного фенотипа.
3. Способность поддерживаться в недифференцированном состоянии в течение длительного времени в культуре *in vitro*.
4. Способность сохранять стабильный кариотип.
5. Способность дифференцироваться не только в соматические клетки, но и в клетки зародышевого пути.
6. При определенных условиях способны к дифференцировке в эмбриоидные тела.



Для сохранения плюрипотентности ЭСК и культивирования необходимо

- 1) **Фидерный (питательный) слой клеток**, который выделяет необходимые факторы роста (- первичные эмбриональные фибробласты, инактивированные митомицином С или гамма-облучением).
- 2) Экспрессия самим ЭСК **транскрипционных факторов роста**, в частности **Oct4**, **Nanog**, Rex-1, Pax-6, Prox-1, нейротрофинов BDNF, NT-3, NT-4



Эмбриоидные тела

ЭСК без фидерного слоя формируют **эмбриоидные тела** – зачатки эндодермы, эктодермы и мезодермы, напоминая при этом постимплантационное эмбриональное развитие.

После прикрепления ЭТ к адгезивному субстрату разрушается система плотных контактов между внешними клетками, что влечет за собой нарушение целостности базальной мембраны и установление контакта внутренних клеток в подложкой. Затем происходит миграция внутренних клеток из ЭТ и их активная пролиферация с последующей дифференцировкой в широкий спектр тканей.

Удвоение ЭСК человека происходит через 30-35ч.

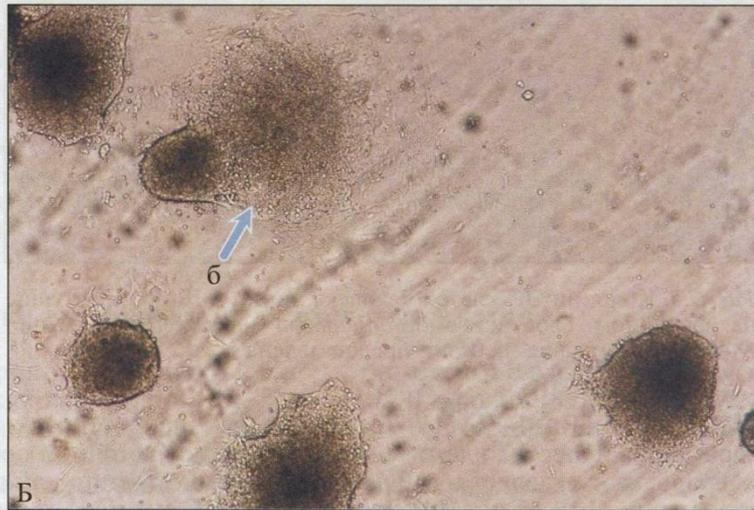
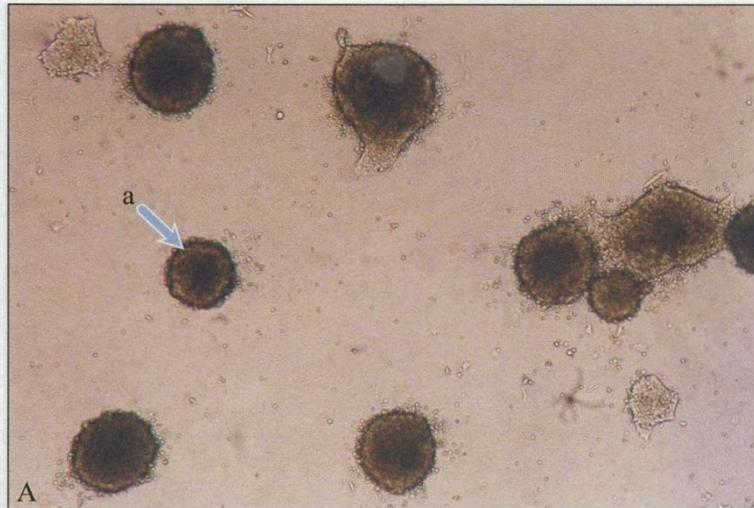


Рис. 7.4. Эмбриоидные тела, полученные из ЭС клеток мыши в культуре ($\times 200$).

а — эмбриоидные тела (ЭТ) на 3—4-й день после прикрепления к желатиновой подложке; б — начало миграции клеток из эмбриоидных тел (стрелкой показаны клетки, мигрирующие из эмбриоидного тела после разрыва внешней оболочки).

Применение ЭСК

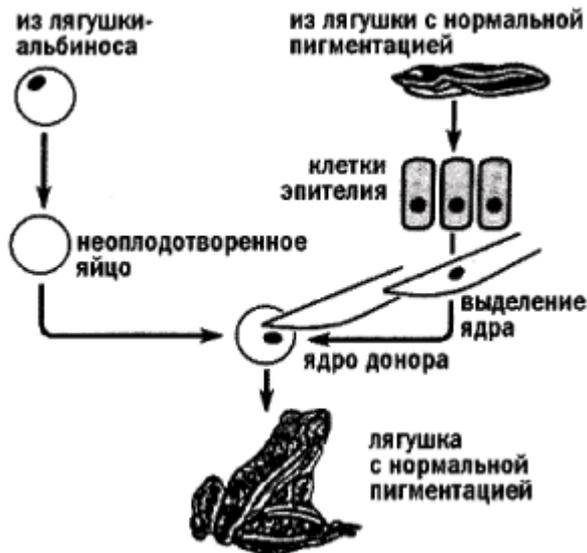
1. Клонирование организмов
2. Изучение начальных стадий эмбриогенеза *in vitro* и *in vivo*
3. Направленная дифференцировка и разработка подходов к клеточной терапии
4. Направленное изменение генома и получение химерных животных

1. Применение ЭСК - Клонирование

Клон – это совокупность генетически однородных особей, полученных путем простого митотического размножения клеток без полового процесса, без хромосомного рекомбинирования.

1928 г. – первое клонирование – получена личинка тритона из отдельных клеток 16-клеточного зародыша.

В 1950-е годы был получен головастик лягушки из зиготы, в которой ее собственное ядро было удалено и заменено ядром из клетки раннего зародыша.

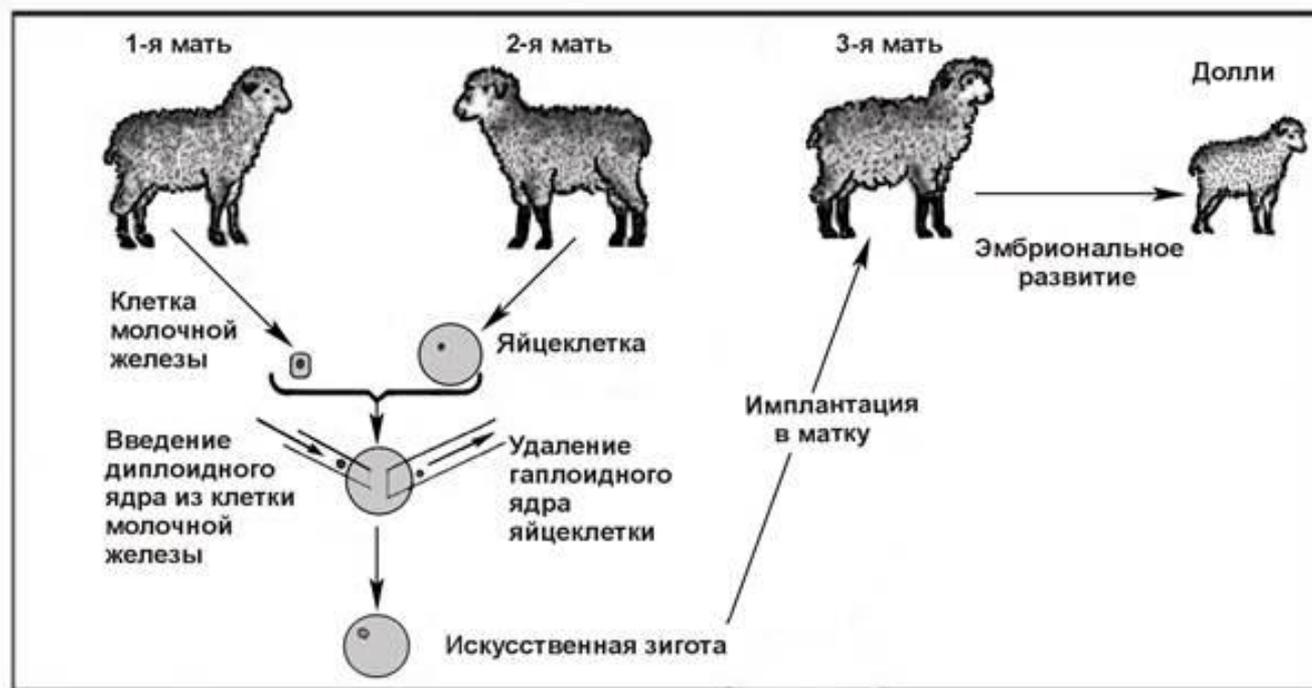


Клонированные организмы генетически идентичны, как однояйцевые братья или сестры. Этим клон отличается от потомков, полученных половым путем, у которых в каждом поколении возникают новые комбинации генов от двух родителей.

1. Применение ЭСК - Клонирование

Главный резон этой технологии – сохранение и рациональное использование генотипов элитных, особо ценных и редких производителей.

Для клонирования берут ядро какой-либо соматической клетки от животного требуемой породы и пересаживают его в яйцеклетку той же или другой особи. Полученную искусственную зиготу возвращают матери, которая и вынашивает потомство.





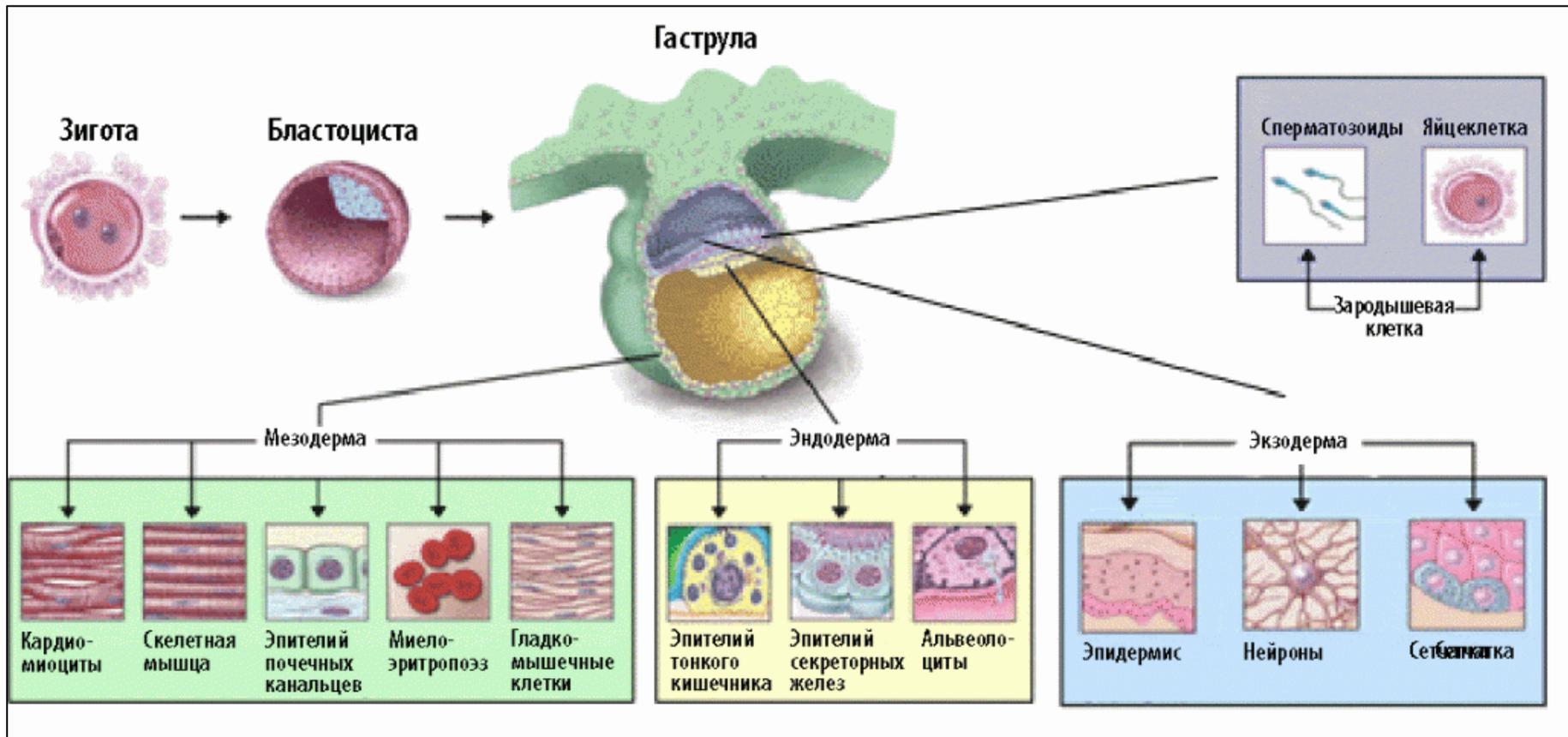
6LL3

(Ученые Ян Вилмут и Кит Кэмпбелл,
1996г.)

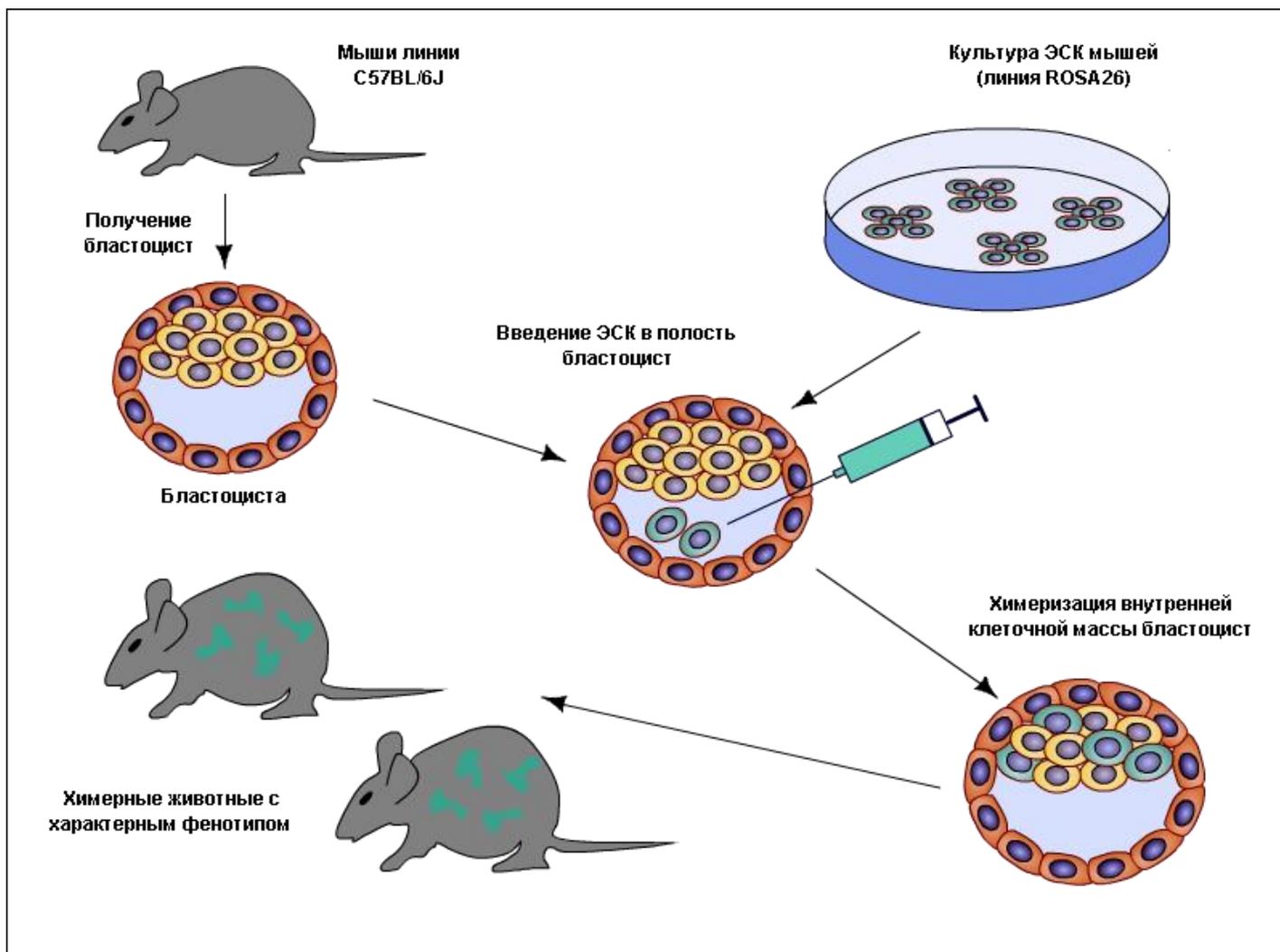


Американская певица Долли Партон

2. Применение ЭСК - Изучение начальных стадий эмбриогенеза



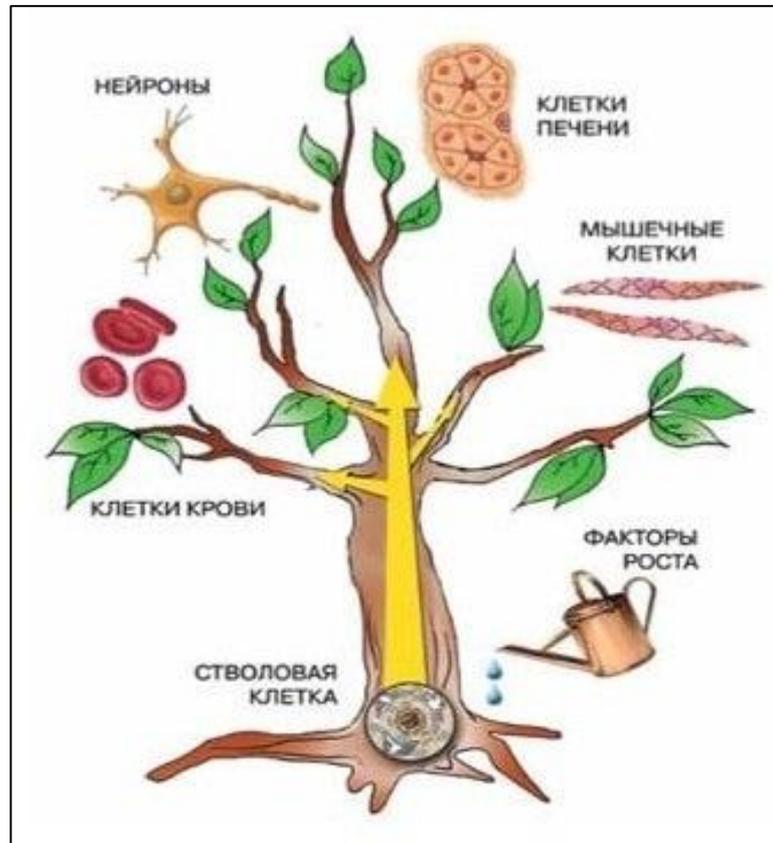
3. Применение ЭСК – получение химерных животных



В 1968г. R. Gardner инъектировал ЭСК крысы в
бластоцеле мышинной бластоцисты
– первая мышь-химера.



4. Применение ЭСК - Направленная дифференцировка и разработка подходов к клеточной терапии



Подходы к направленной дифференцировке ЭСК

1. Использование факторов роста и дифференцировки
2. Использование генетически модифицированных клеток фидера для индукции определенных типов клеточной дифференцировки
3. Генетические модификации ЭСК для индукции направленной дифференцировки или сохранения клеток в недифференцированном состоянии
4. Трансплантация в различные органы взрослых животных (мозг, печень, селезенка и др.)
5. Получение трансгенных животных.



Использования фидерного слоя для дифференцировки ЭСК

Эксперимент: ЭСК мыши культивировали на фидерном слое стромальных клеток линии OP9, необходимых для активации соответствующих рецепторов Notch.

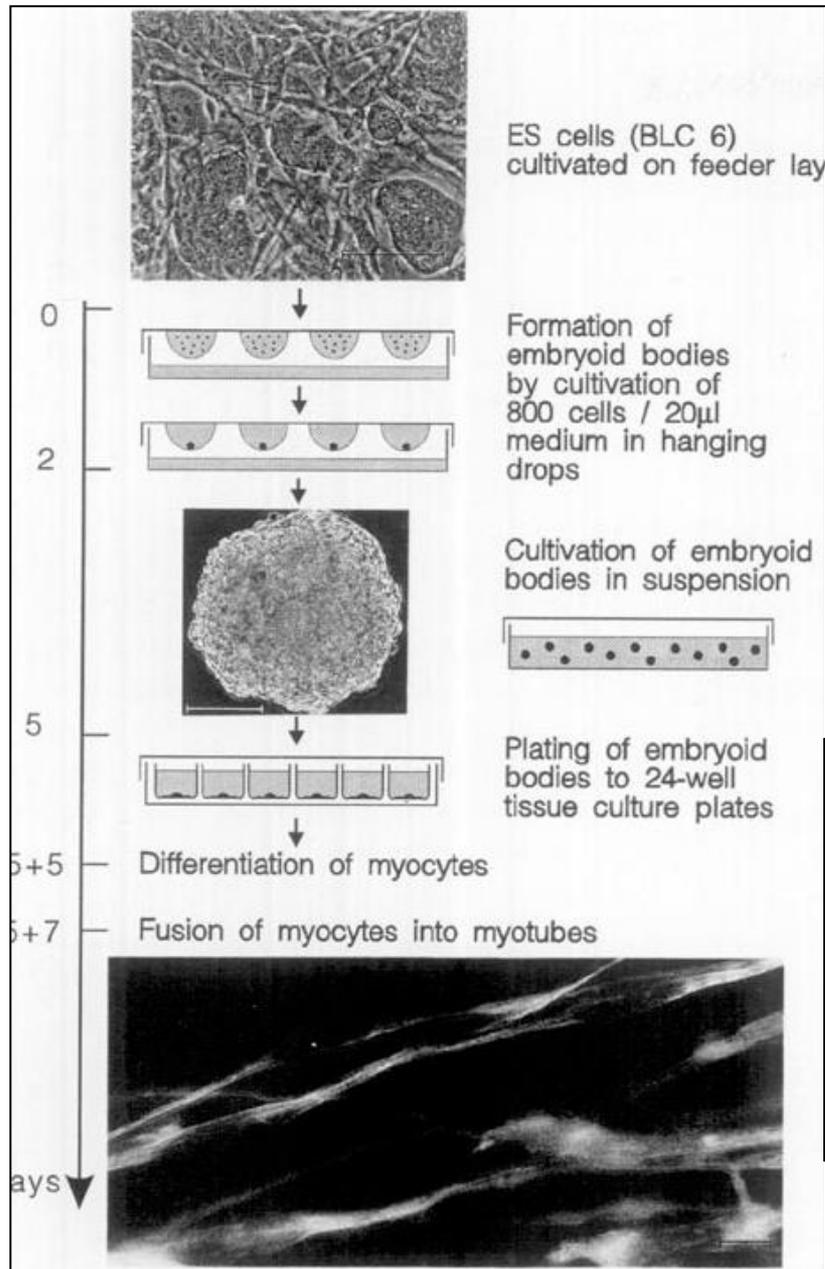
Результат: дифференцировка ЭСК в Т-лимфоциты, которые экспрессировали на своей поверхности специфические для этого типа маркёры.

nature
immunology

Induction of T cell development and establishment of T cell competence from embryonic stem cells differentiated *in vitro*

Thomas M Schmitt¹, Renée F de Pooter¹, Matthew A Gronski², Sarah K Cho^{1,3}, Pamela S Ohashi² & Juan Carlos Zúñiga-Pflücker¹

Направленная дифференцировка под действием факторов роста (в данной статье - ретиноевая кислота)



DEVELOPMENTAL BIOLOGY 164, 87-101 (1994)

Muscle Cell Differentiation of Embryonic Stem Cells Reflects Myogenesis
in Vivo: Developmentally Regulated Expression of Myogenic
Determination Genes and Functional Expression of Ionic Currents

J. ROHWEDEL,* V. MALTSEV,* E. BOBER,† H.-H. ARNOLD,‡ J. HESCHELER,‡ AND A. M. WOBUS*

*Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, D-06466 Gatersleben, Germany; †Department of Cell and Molecular Biology, University of
Braunschweig, D-38106 Braunschweig, Germany; and ‡Institute of Pharmacology, FU Berlin, D-14195 Berlin, Germany

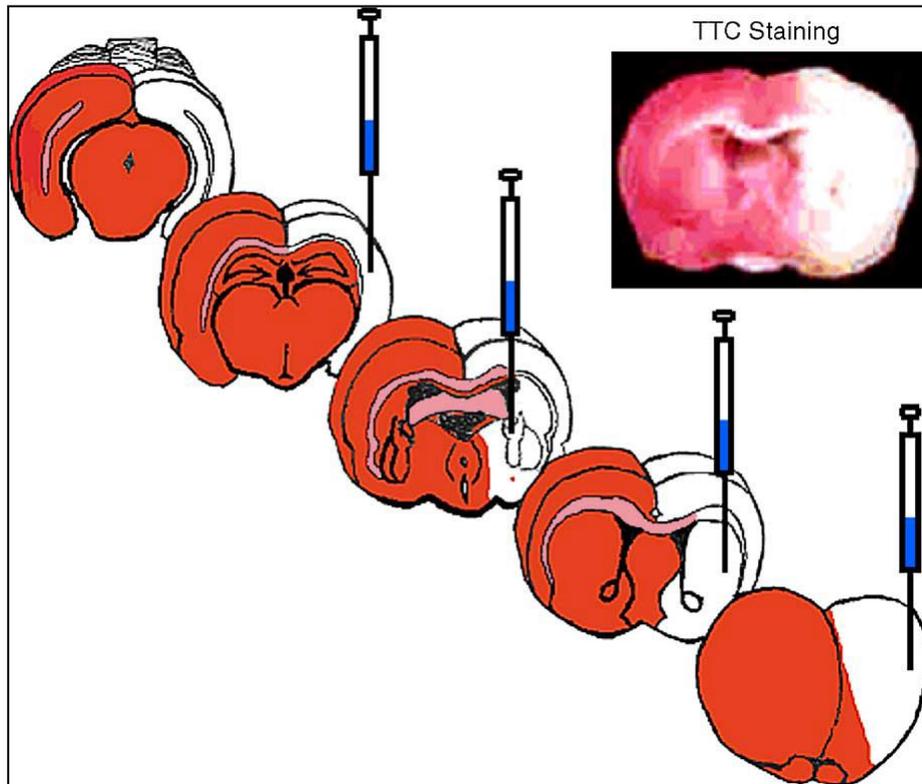
Accepted February 8, 1994

[http://www.sciencedirect.com/science/article/
pii/S0012160684711821?via%3Dihub](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160684711821?via%3Dihub)

Генетическая модификация для направленной дифференцировки ЭСК



Генетическая модификация для направленной дифференцировки ЭСК



**Neurobiology
of Disease**

www.elsevier.com/locate/ynbdi
Neurobiology of Disease 19 (2005) 183–193

Transplantation of embryonic stem cells overexpressing Bcl-2 promotes functional recovery after transient cerebral ischemia

Ling Wei,^{a,c,*} Lin Cui,^{a,c} B. Joy Snider,^a Mark Rivkin,^b Steven S. Yu,^a Chul-Sang Lee,^a Larry D. Adams,^a David I. Gottlieb,^b Eugene M. Johnson Jr.,^a Shan Ping Yu,^{a,c,d} and Dennis W. Choi^a

^aCenter for the Study of Nervous System Injury and Department of Neurology, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO 63110, USA

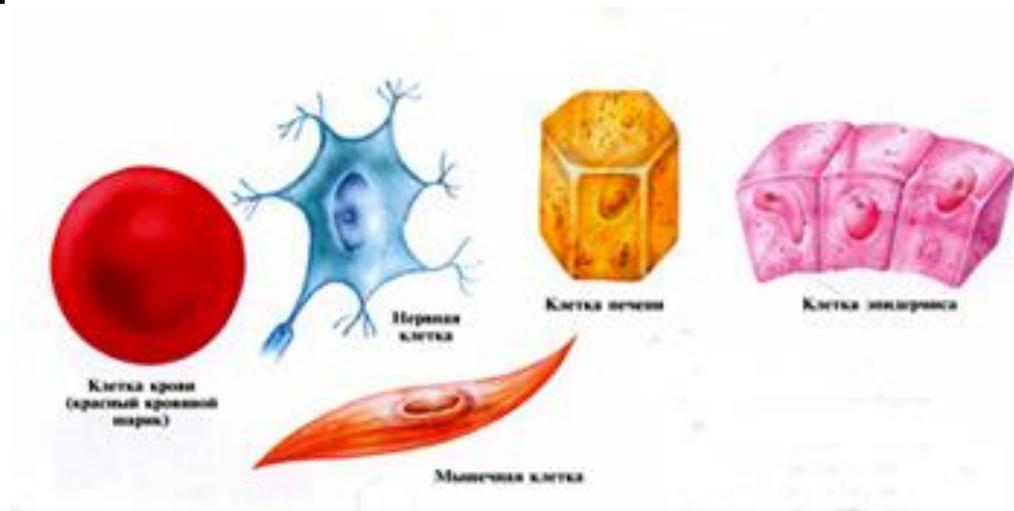
^bDepartment of Anatomy and Neurobiology, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO 63110, USA

^cDepartment of Pathology, Medical University of South Carolina, PO Box 250908, Charleston, SC 29425, USA

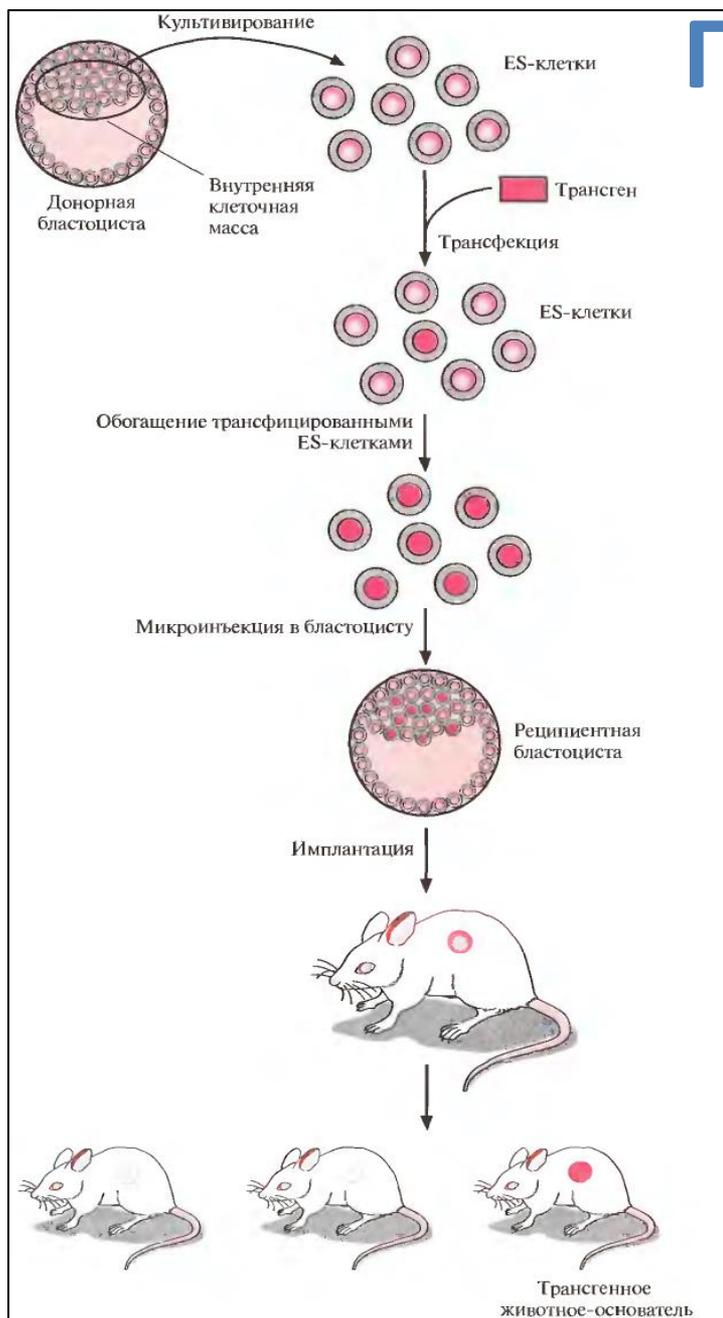
^dDepartment of Pharmaceutical Sciences, Medical University of South Carolina, Charleston, SC 29425, USA

Возможные направления дифференцировки ЭСК

- кардиомиоциты
- клетки нервной системы (нейроны и глия)
- гемопоэтические клетки
- инсулин-продуцирующие клетки
- гепатоциты



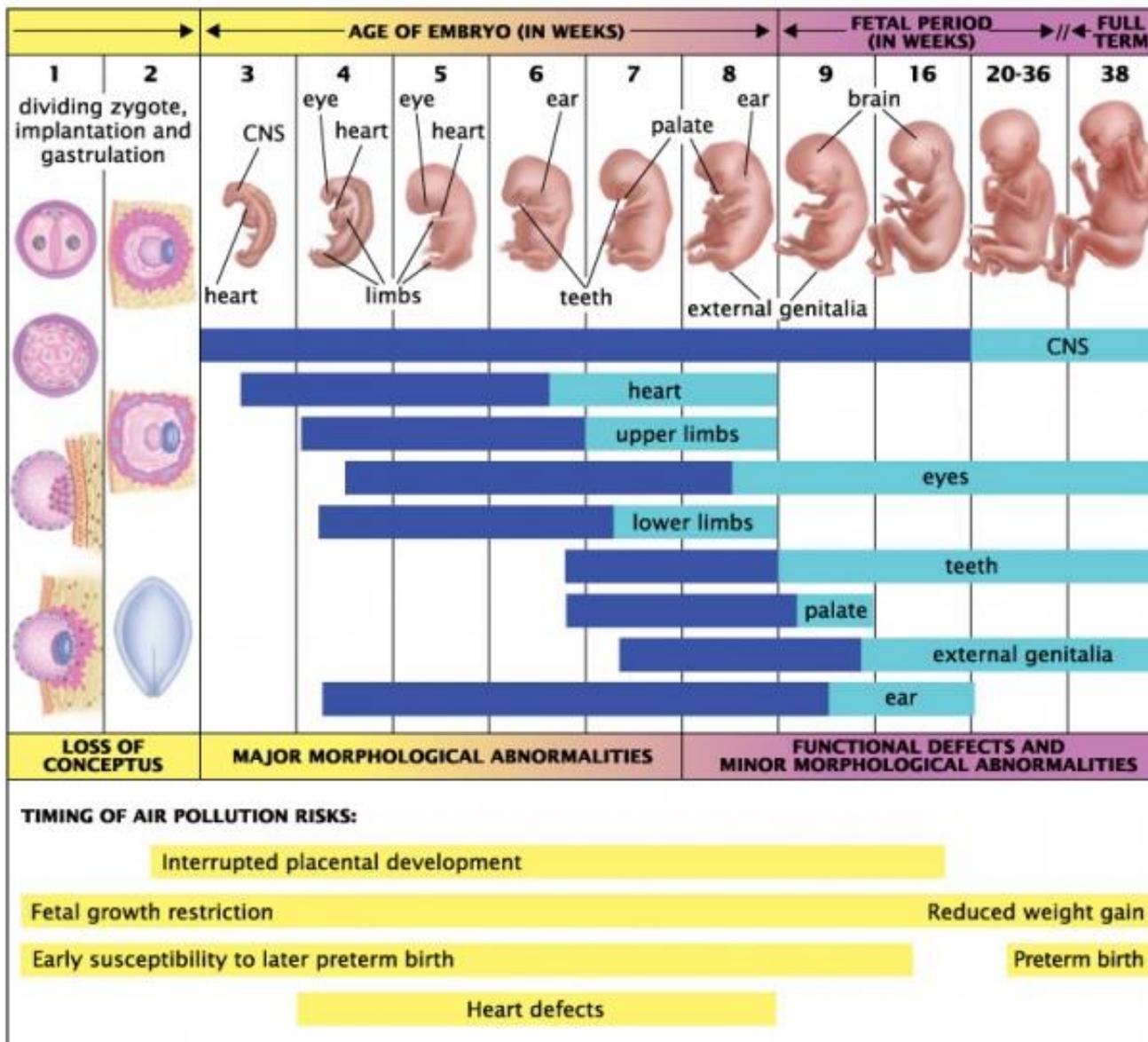
Получение трансгенных ЖИВОТНЫХ



Стратегия :

1. Клонированный ген вводят в ядро оплодотворенной яйцеклетки.
2. 2. Оплодотворенные яйцеклетки с экзогенной ДНК имплантируют в реципиентную женскую особь (поскольку успешное завершение развития эмбриона млекопитающих в иных условиях невозможно).
3. 3. Отбирают потомков, развившихся из имплантированных яйцеклеток, которые содержат клонированный ген во всех клетках.
4. 4. Скрещивают животных, которые несут клонированный ген в клетках зародышевой линии, и получают новую генетическую линию.

Эмбрион-плод



Note: Blue bars indicate time periods when major morphological abnormalities can occur, while light blue bars correspond to periods at risk for minor abnormalities and functional defects.

Фетальные стволовые клетки

- Получают из абортивного материала на 9-12 неделе беременности.
- Клетки уже получили свое определенное развитие в организме, следовательно:
 - А) не являются опасными с точки зрения онкологии
 - Б) могут пройти ограниченное число делений
 - В) могут дать начало не любым, а только определенным видам специализированных клеток (фетальная печень – клетки печени или кроветворные клетки; фетальная нервная ткань – клетки нервной системы).



Общие свойства стволовых клеток

1. Рост в условии *in vitro*
2. Пролиферация
3. Дифференцировка (спонтанная и индуцированная)
4. Экспрессия факторов транскрипции
5. Наличие специфических маркёров (CD90, CD117, CD45 и т.д.)
6. Способность сохранять свойства после заморозки

Классификация стволовых клеток по Вайгерс и Вайсману:

- тотипотентные (способные дать начало все эмбриону и экстраэмбриональным тканям),
- плюрипотентные (продуцирующие все клетки эмбриона),
- мультипотентные (дающие начало группе клеточных линий),
- олигопотентные (дающие начало более ограниченному числу клеточных линий, чем мультипотентные)
- унипотентные (дающие начало только одному типу зрелых клеток).

Механистическая классификация стволовых клеток по Рао:

- эмбриональные(клетки эмбриональной карциомы, эмбриональная герминальная клетки, эмбриональная стволовая клетка),
- фетальные,
- взрослые и специфические для разных тканей(кроветворные, мезенхимальные, предшественники эндотелиальных клеток, мышечные, нейральные, эпидермальные и др. соматические стволовые клетки).

Предел Хейфлика

«Предел Хейфлика» – в 1961 г. Хейфлик и сотрудники показали, что даже в идеальных условиях бласт эмбриона человека способен делиться только ограниченное количество раз (50-80). В 1971г. Оловников предложил гипотезу, что при каждом делении клетки её ДНК укорачивается, что ограничивает пролиферативный потенциал клеток. Открытие теломеразы – фермента, достраивающего укороченную ДНК в половых клетках и клетках опухолей, обеспечивая их бессмертие, подтвердило гипотезу Оловникова.

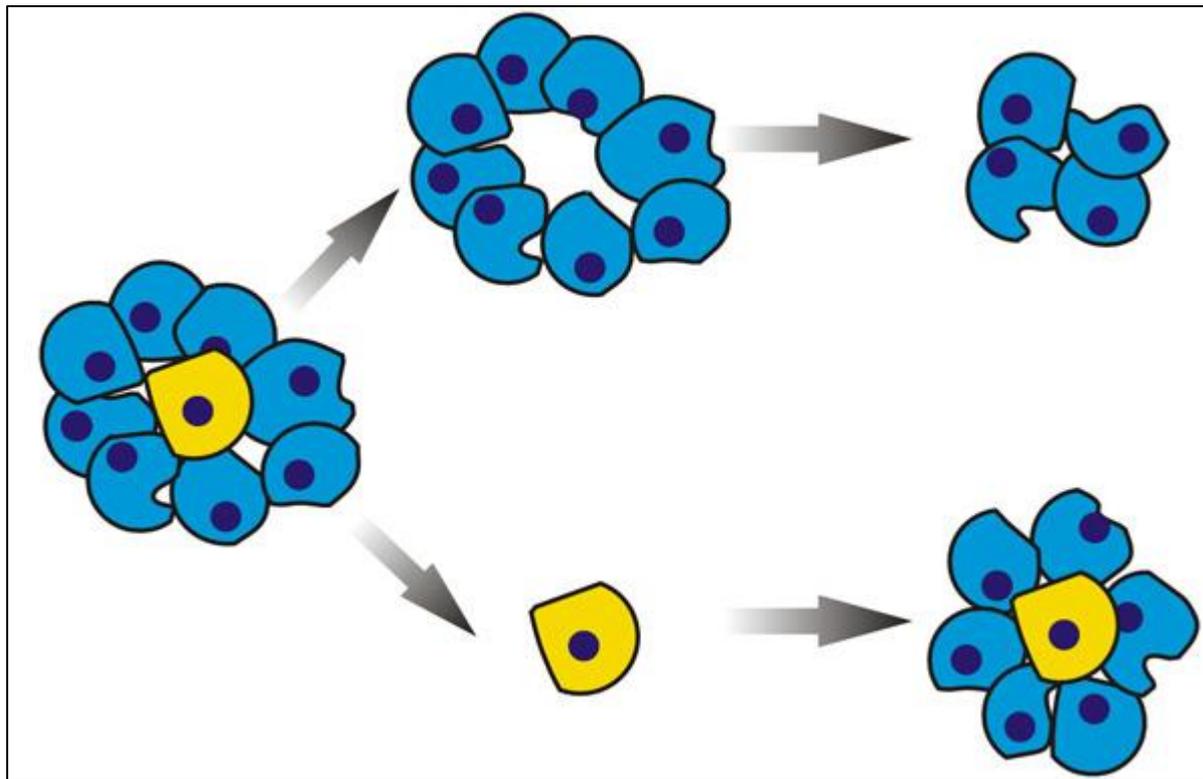


Leonard Hayflick



Алексей Владимирович Оловников

Раковые стволовые клетки.



Опухоль состоит из раковых стволовых клеток (*желтые*) и дифференцированных клеток (*синие*). Если лечить рак стандартной химиотерапией (*нижняя часть схемы*), то стволовые клетки могут выживать, и опухоль опять будет расти. Если же терапия будет направлена на уничтожение именно стволовых клеток (*верхняя часть схемы*), то опухоли не будут давать рецидивов. Изображение с сайта en.wikipedia.org



Когда ты вырастешь,
ты станешь тем,
кем захочешь.

РОДИТЕЛЬСКИЙ СОВЕТ
СТВОЛОВОЙ КЛЕТКИ

Необходимое условия для культивирования ЭСК in vitro

Наличие фидерного слоя – для сохранения недифференцированного состояния ЭСК.

- первичные эмбриональные фибробласты, инактивированные **митомицином С** или **гамма-облучением**.

