

## **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

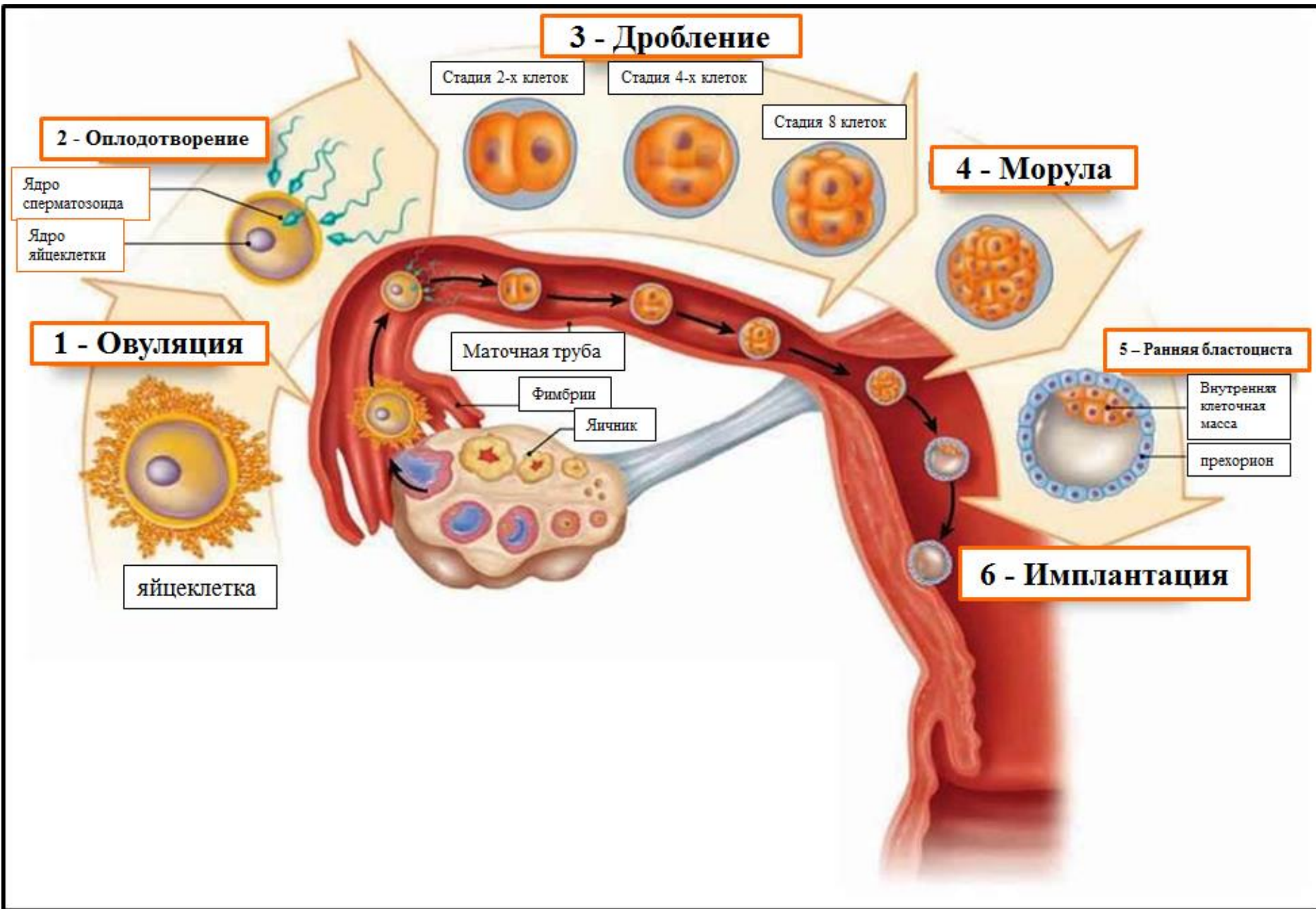
прехорион

### 6 - Имплантация

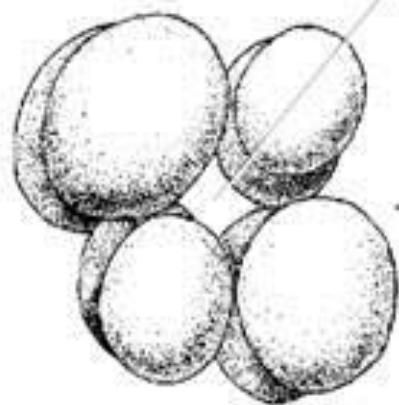
Маточная труба

Фимбрии

Яичник

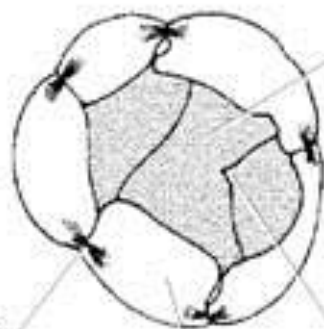


**Ранняя  
8-клеточная стадия**



Большие  
межклеточные  
пространства

**Морула**



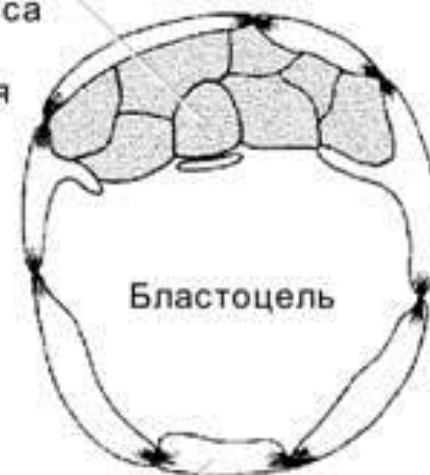
Плотный  
контакт

Наружная  
клетка

Внутренняя  
клетка

Щелевой  
контакт

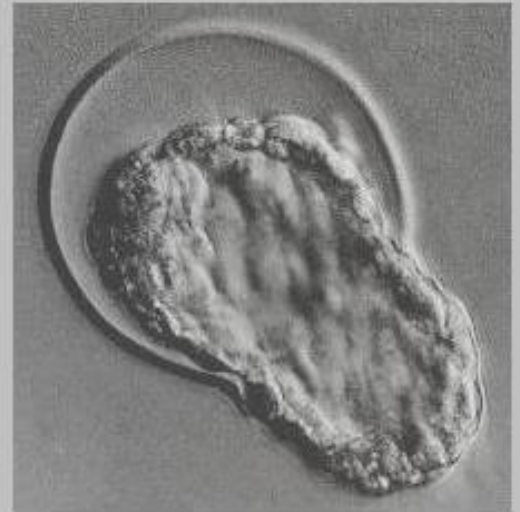
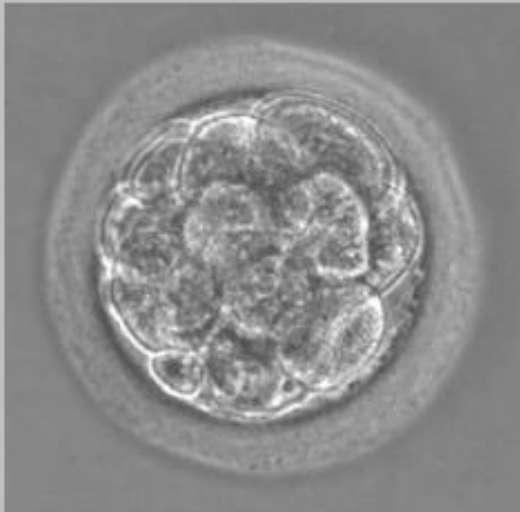
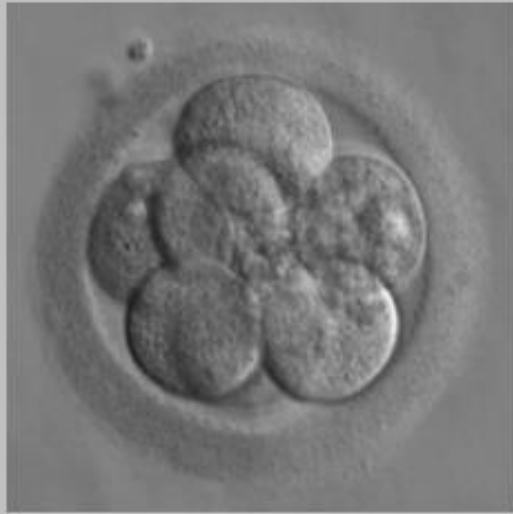
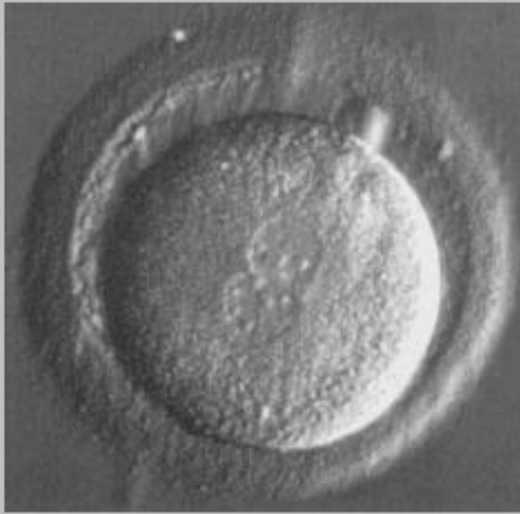
**Бластоциста**

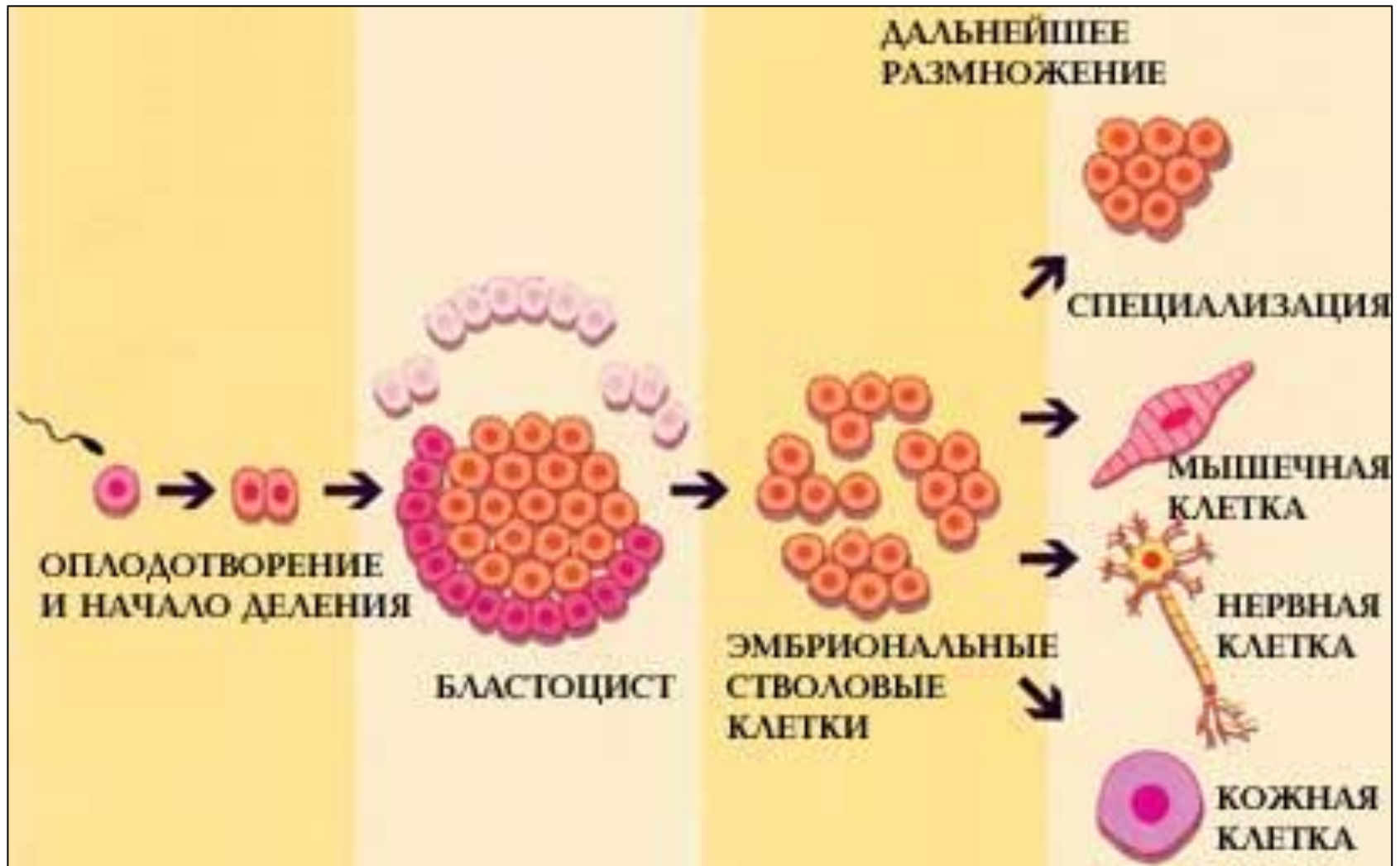


Внутренняя  
клеточная  
масса

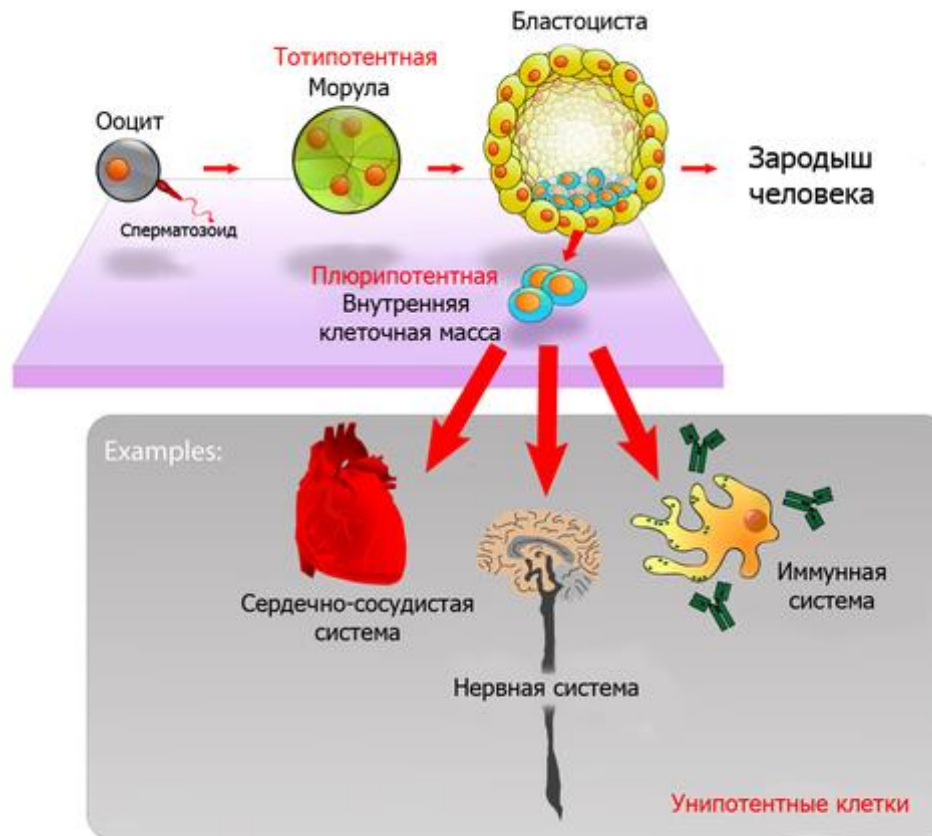
Бластоцель

Клетка трофобласта





Внутренняя клеточная масса бластоциста – эмбриональные стволовые клетки

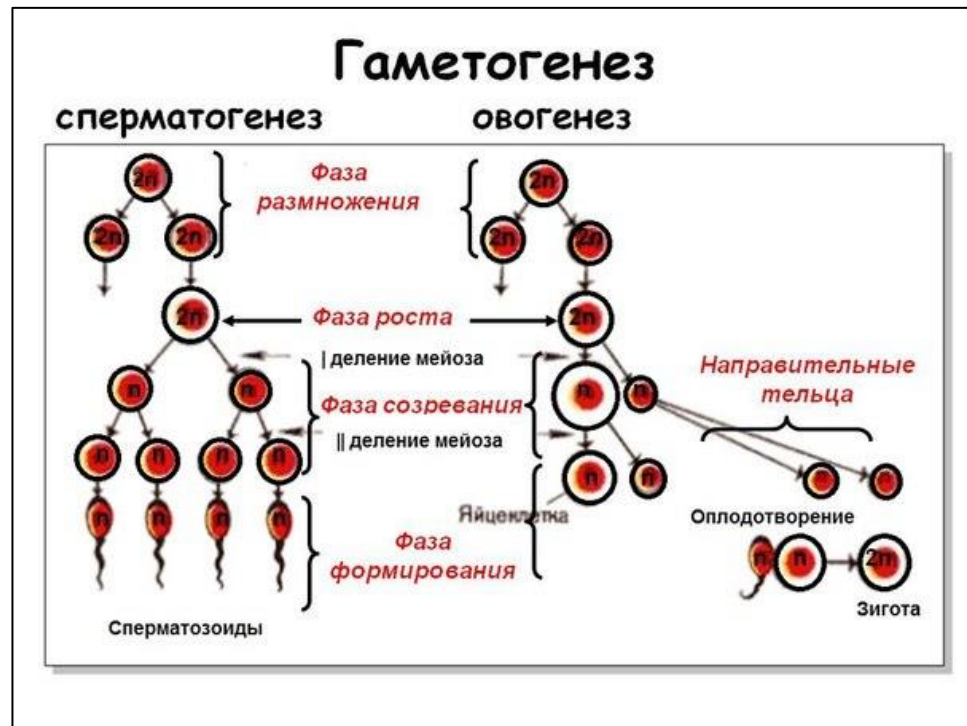
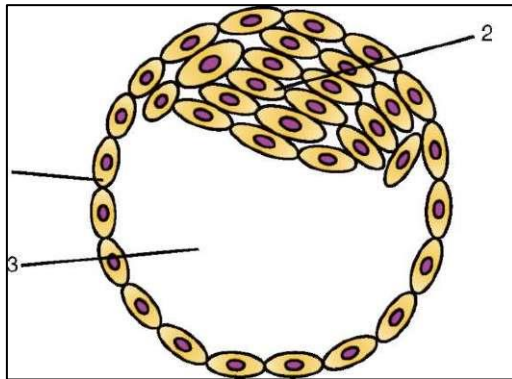


**Эмбриональные стволовые клетки** выделили из мышинных эмбрионов в 1981 году Мартин Эванс (лауреатом Нобелевской премии по физиологии и медицине 2008 года) и Мэтью Кауфман, а также независимо от них Гэйл Мартин.

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

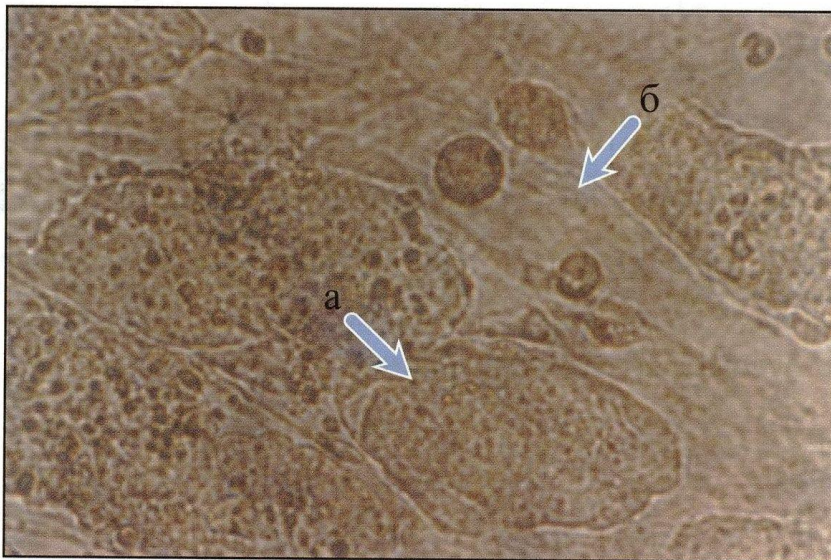
## Типы ЭСК:

- 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 – гоноциты (эмбриональная клетка, из которой впоследствии могут образоваться сперматозоиды или яйцеклетки)



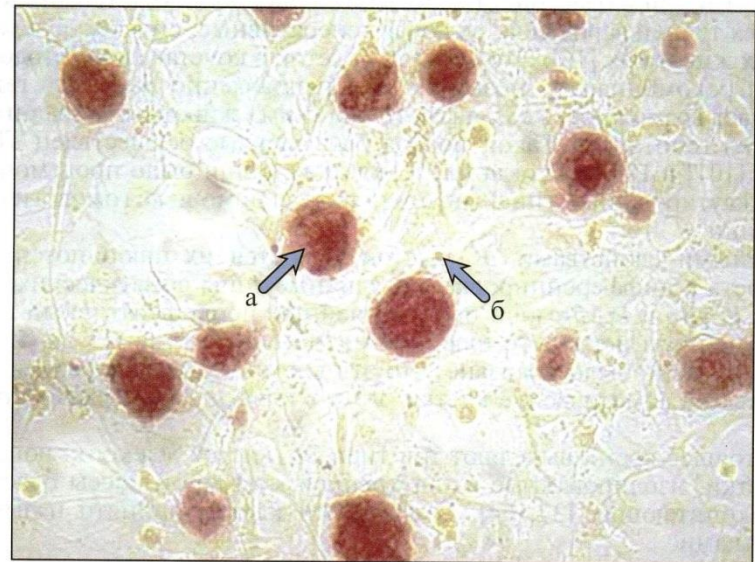
## Внешние признаки ЭСК:

- 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.



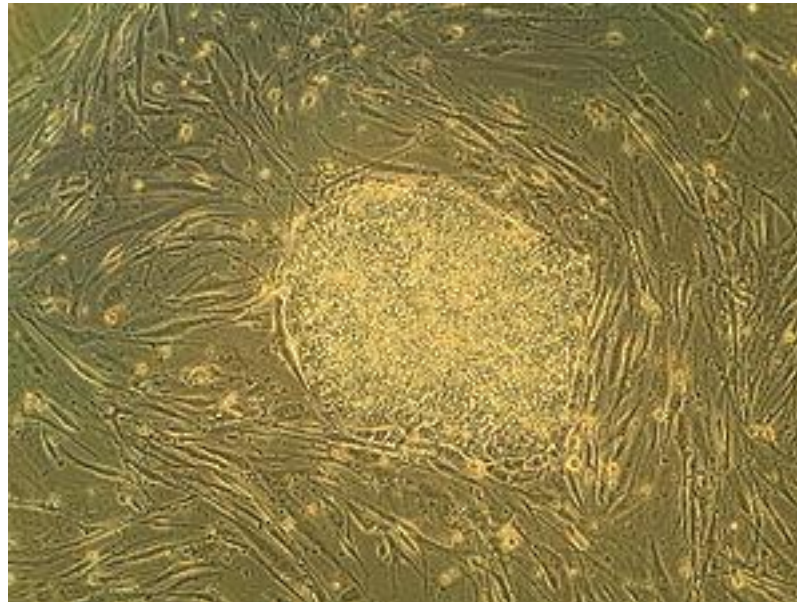
*Рис. 7.2.* Выявление активности щелочной фосфатазы в культурах ЭС клеток мыши, растущих на фидерном слое из эмбриональных фибробластов мыши ( $\times 200$ ).

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



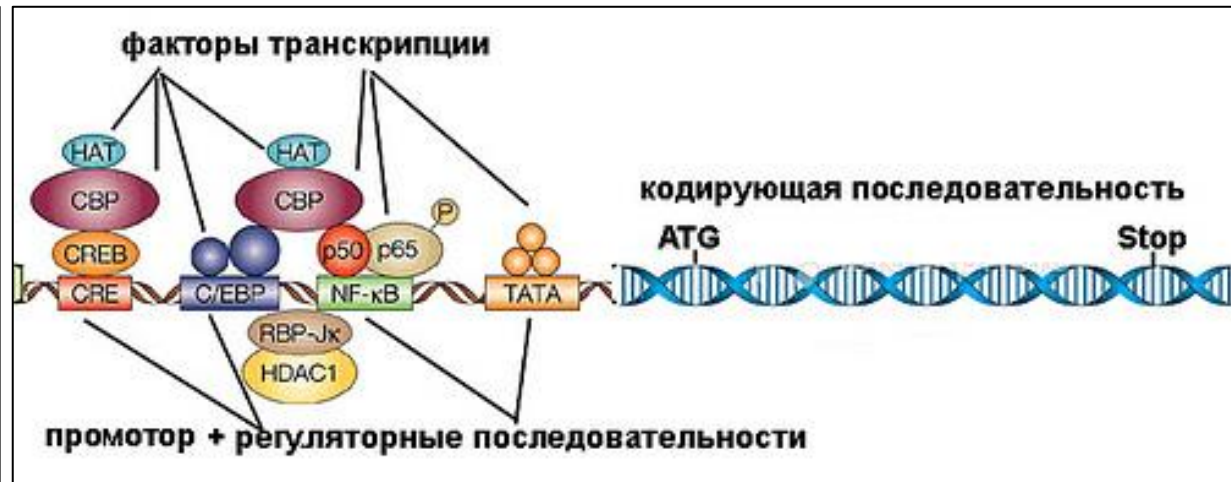
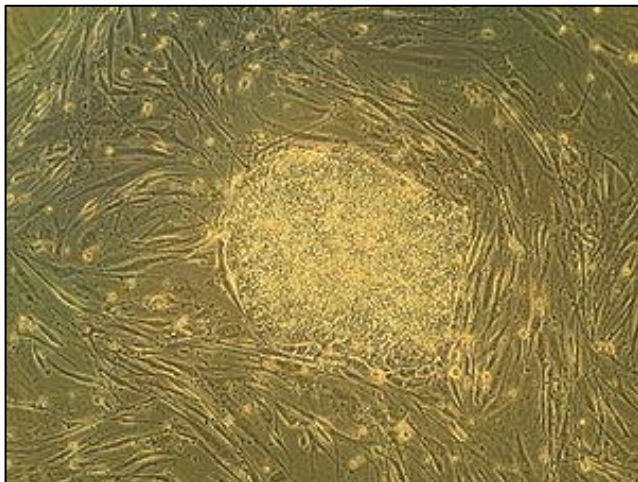
# Свойства ЭСК

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



# Эмбрионидные тела

ЭСК без фидерного слоя формируют **эмбрионидные 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.

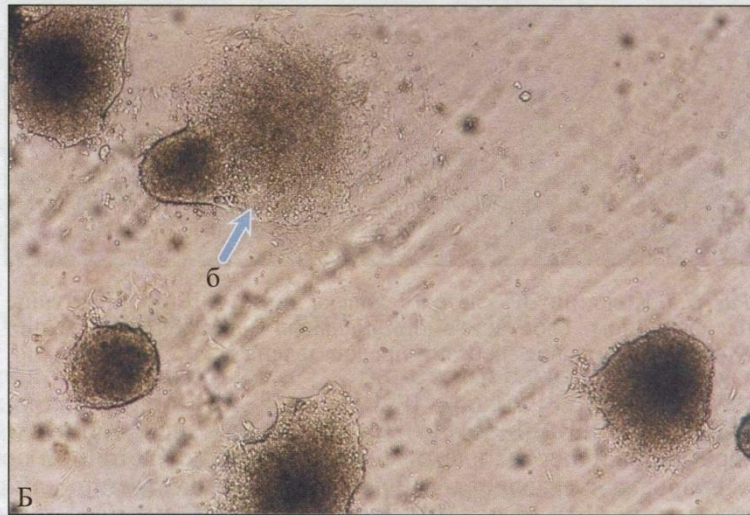
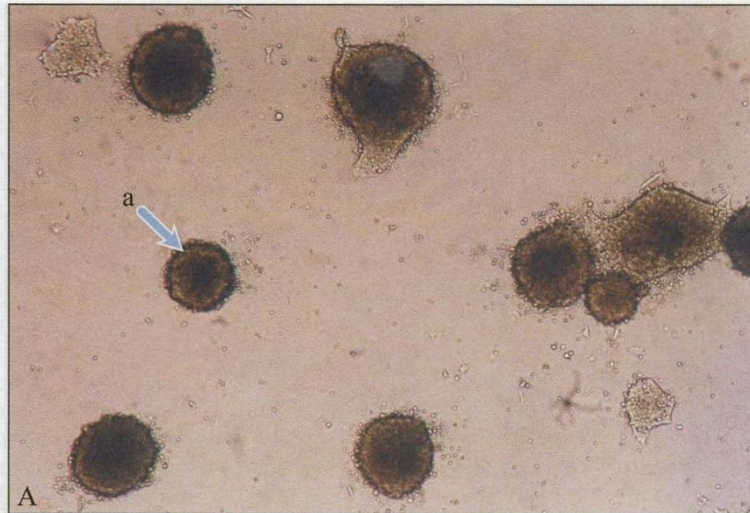


Рис. 7.4. Эмбрионидные тела, полученные из ЭС клеток мыши в культуре ( $\times 200$ ).

а — эмбрионидные тела (ЭТ) на 3—4-й день после прикрепления к желатиновой подложке; б — начало миграции клеток из эмбрионидных тел (стрелкой показаны клетки, мигрирующие из эмбрионидного 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.

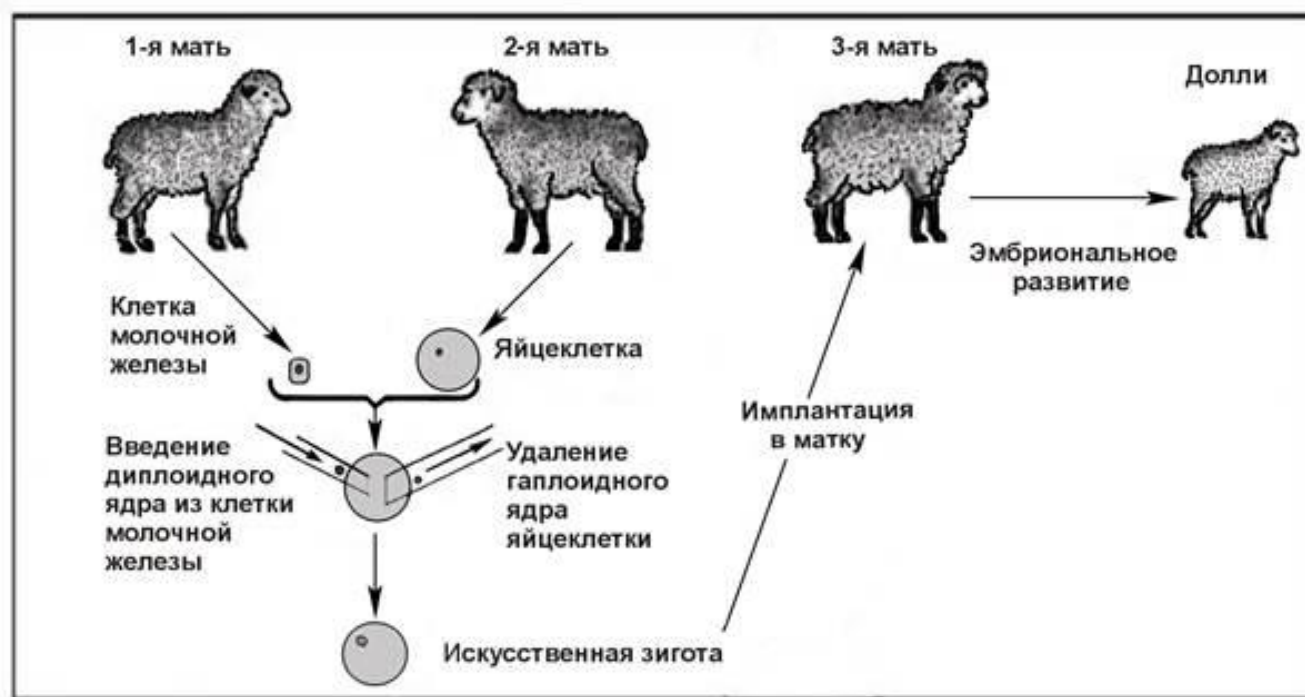


Клонированные организмы генетически идентичны, как однояйцевые братья или сестры. Этим клон отличается от потомков, полученных половым путем, у которых в каждом поколении возникают новые комбинации генов от двух родителей.

# 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.





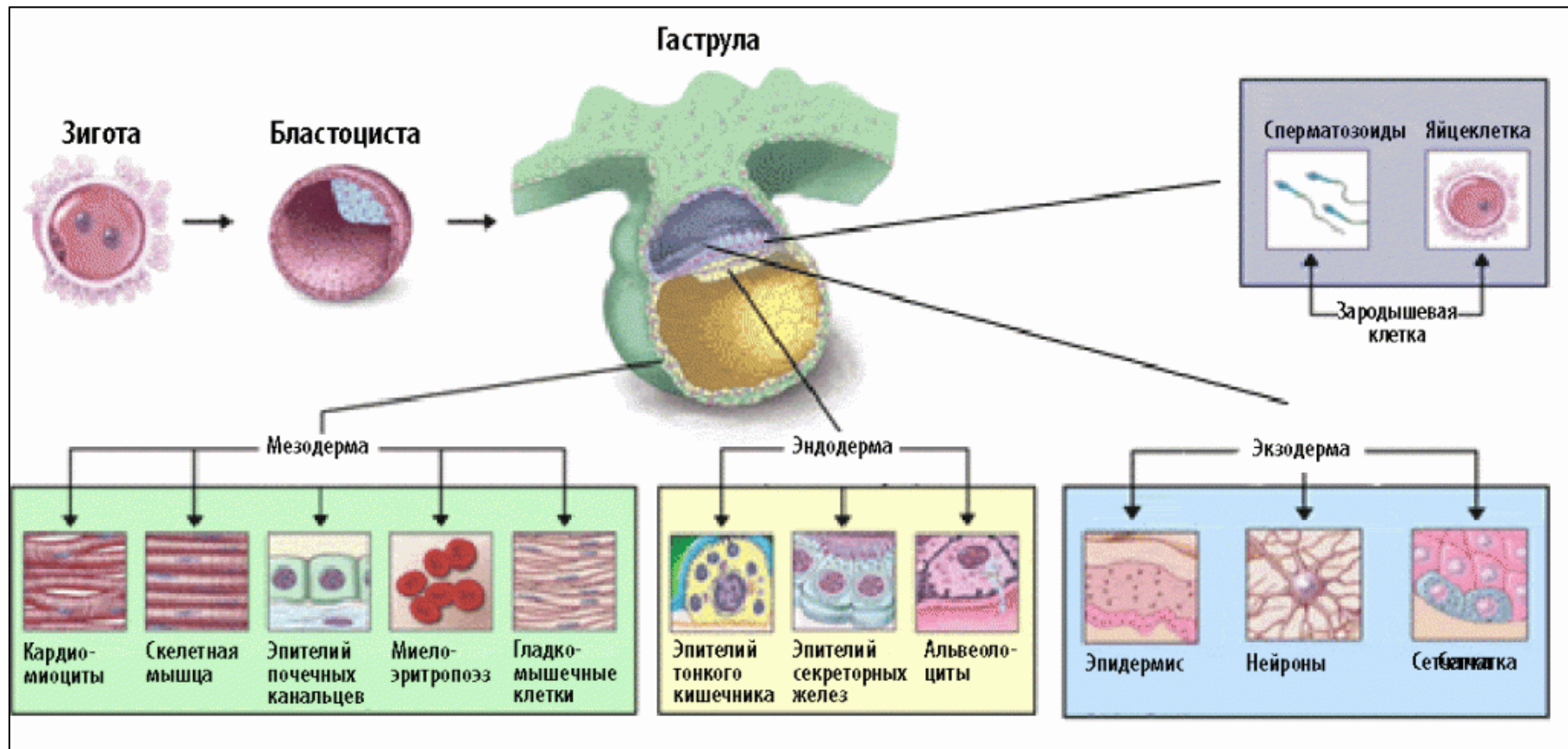
6LL3

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



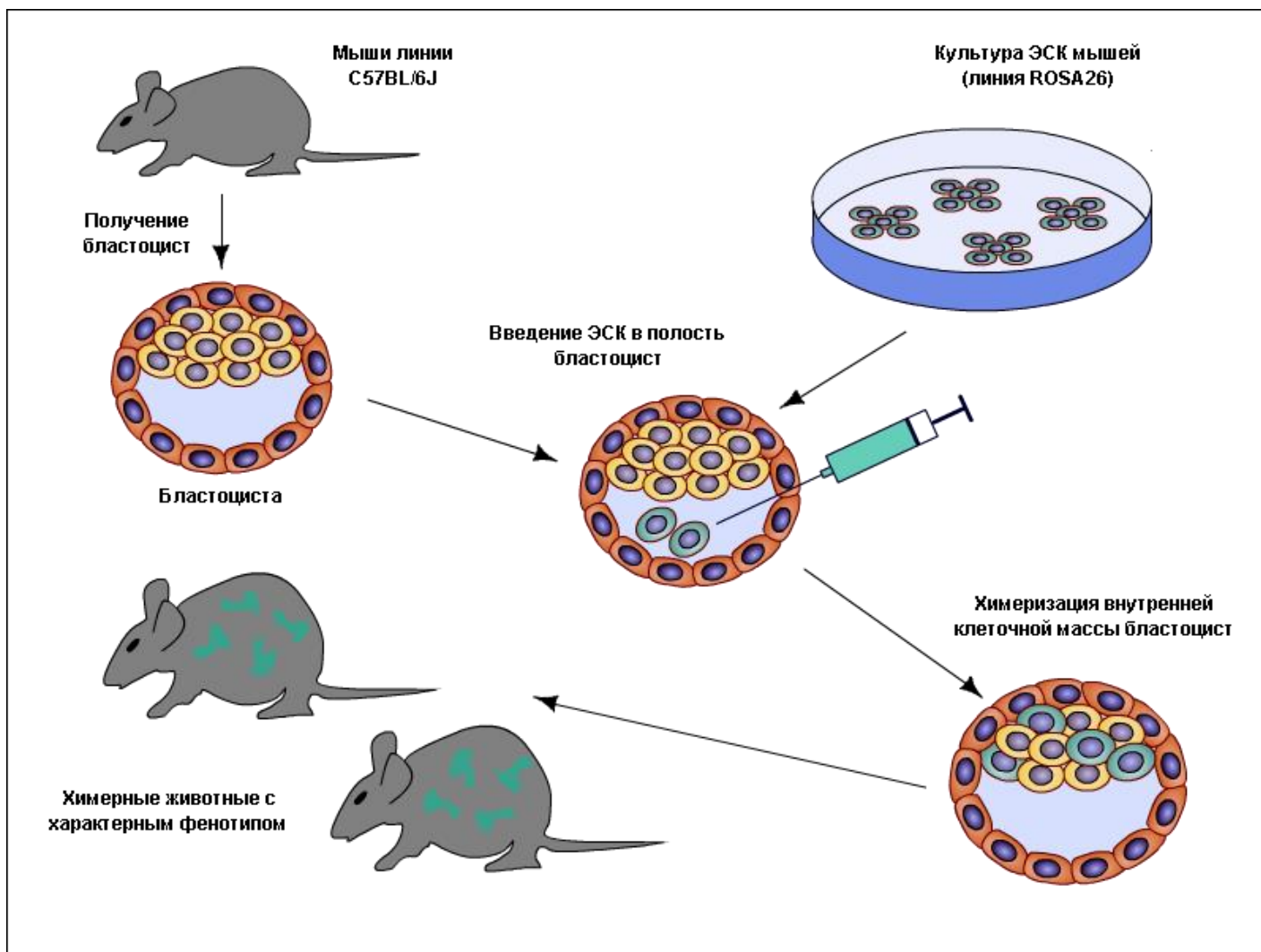
Американская певица Долли Партон

# 2. Применение ЭСК - Изучение начальных стадий эмбриогенеза





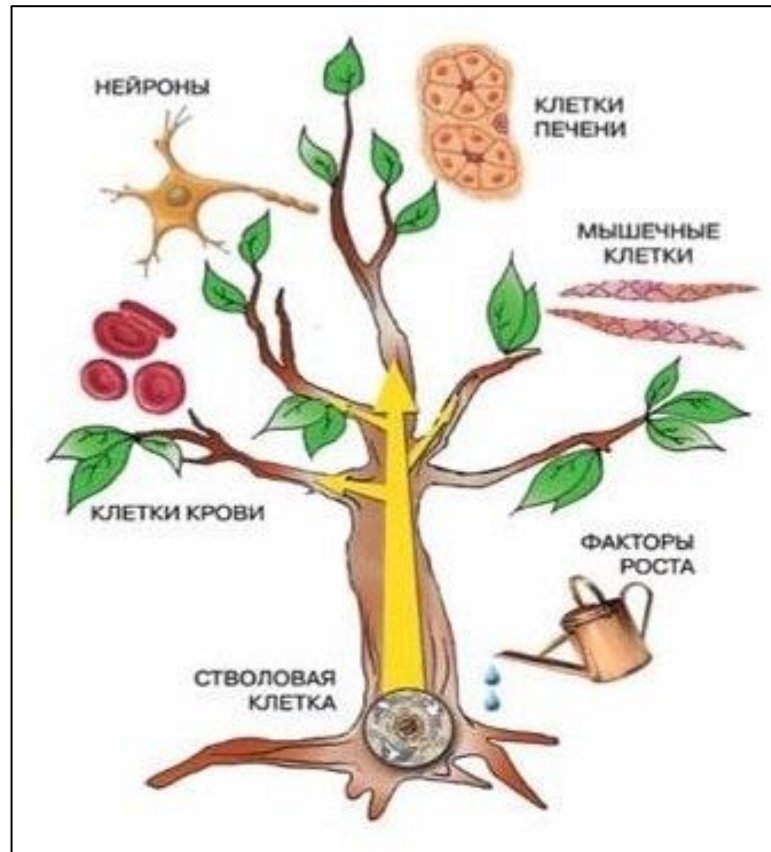
# 3. Применение ЭСК – получение химерных животных



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.

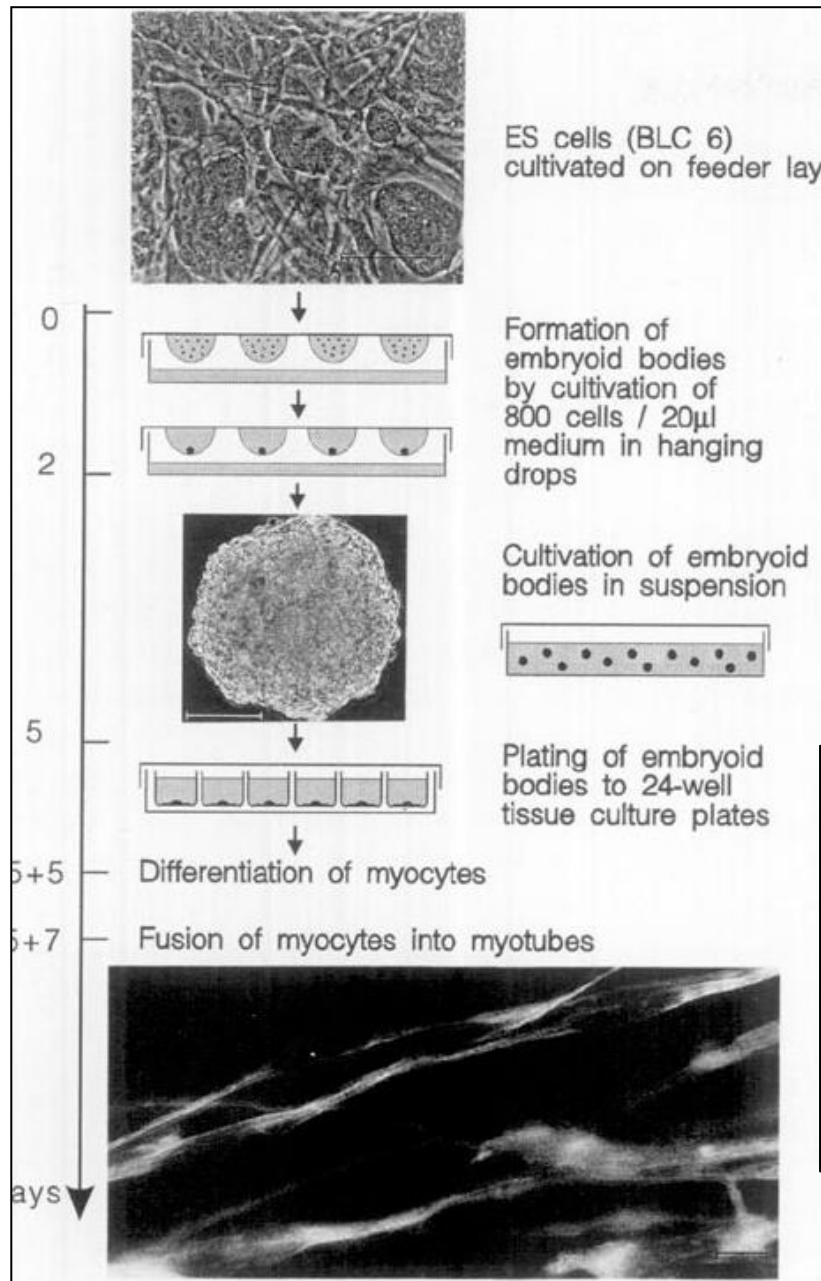
**Результат:** дифференцировка ЭСК в Т-лимфоциты, которые экспрессировали на своей поверхности специфические для этого типа маркёры.

nature  
immunology

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

Thomas M Schmitt<sup>1</sup>, Renée F de Pooter<sup>1</sup>, Matthew A Gronski<sup>2</sup>, Sarah K Cho<sup>1,3</sup>, Pamela S Ohashi<sup>2</sup> & Juan Carlos Zúñiga-Pflücker<sup>1</sup>

# 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

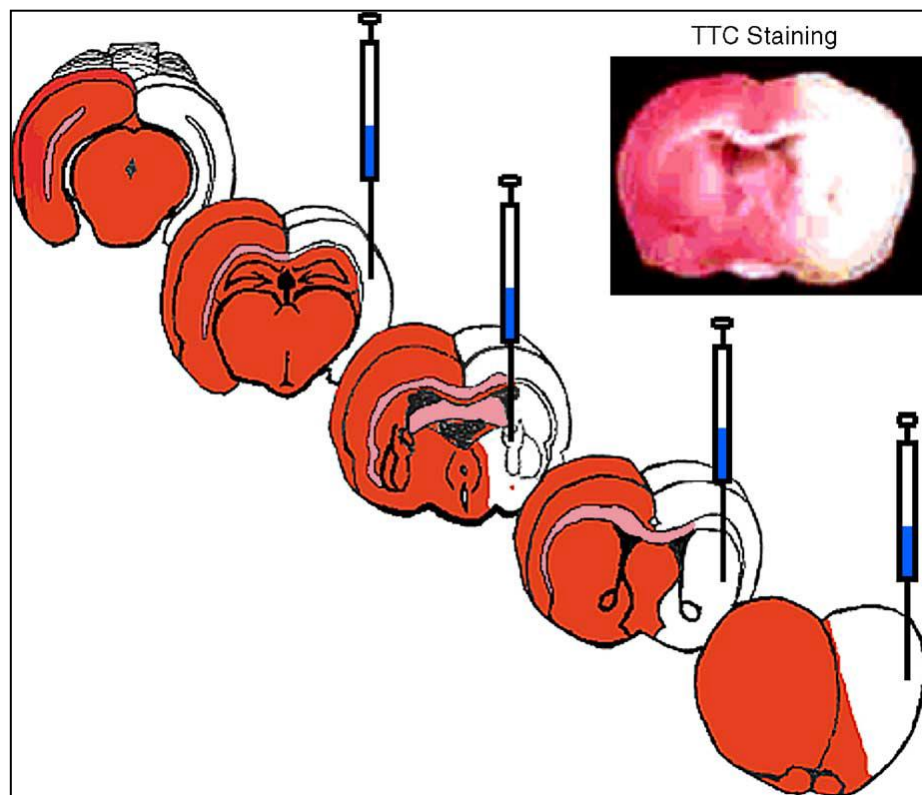
Accepted February 8, 1994

[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,<sup>a,c,\*</sup> Lin Cui,<sup>a,c</sup> B. Joy Snider,<sup>a</sup> Mark Rivkin,<sup>b</sup> Steven S. Yu,<sup>a</sup> Chul-Sang Lee,<sup>a</sup> Larry D. Adams,<sup>a</sup> David I. Gottlieb,<sup>b</sup> Eugene M. Johnson Jr.,<sup>a</sup> Shan Ping Yu,<sup>a,c,d</sup> and Dennis W. Choi<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Center for the Study of Nervous System Injury and Department of Neurology, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO 63110, USA

<sup>b</sup>Department of Anatomy and Neurobiology, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO 63110, USA

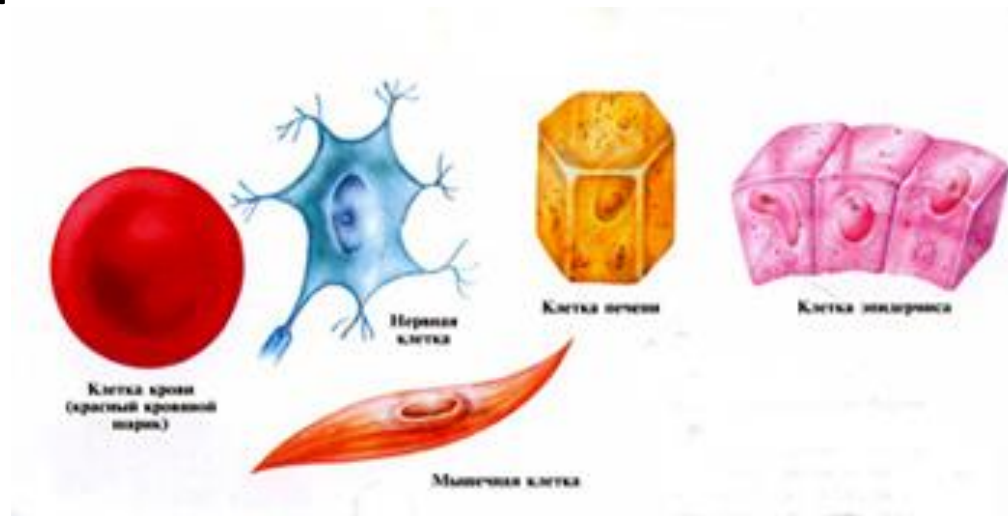
<sup>c</sup>Department of Pathology, Medical University of South Carolina, PO Box 250908, Charleston, SC 29425, USA

<sup>d</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, Medical University of South Carolina, Charleston, SC 29425, USA

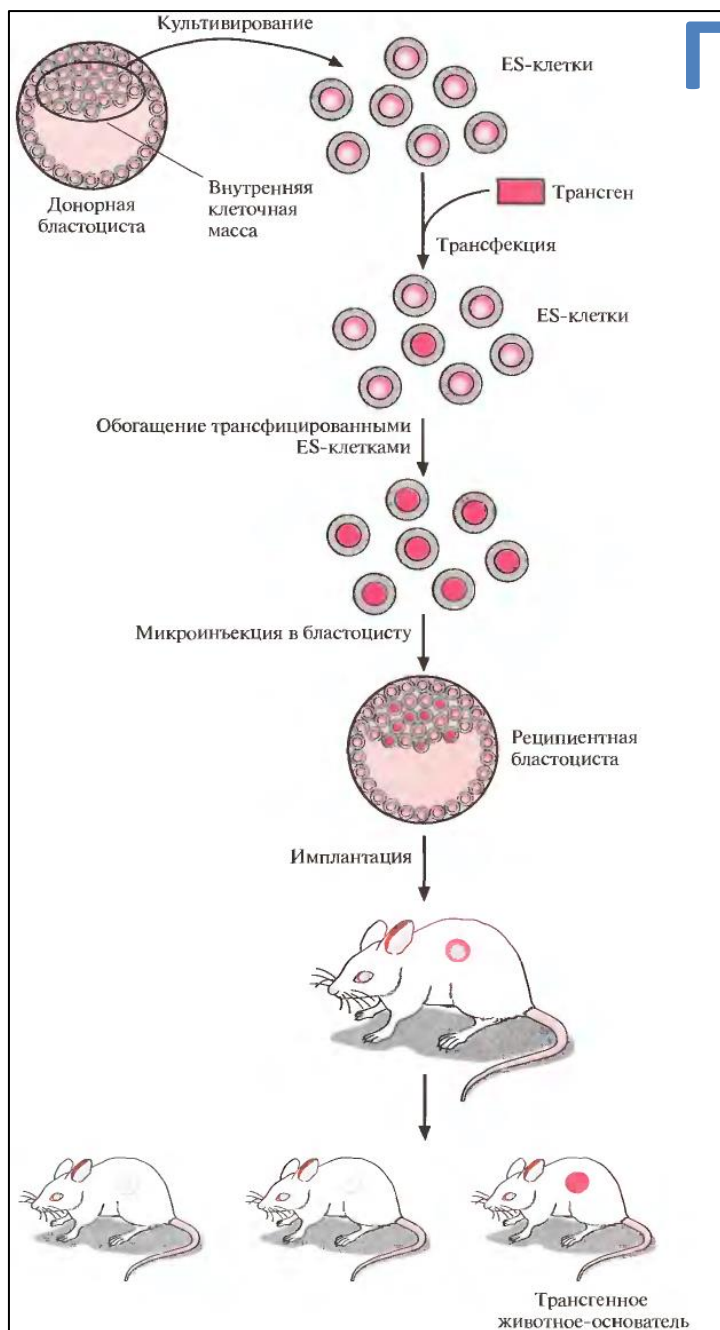


# Возможные направления дифференцировки ЭСК

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



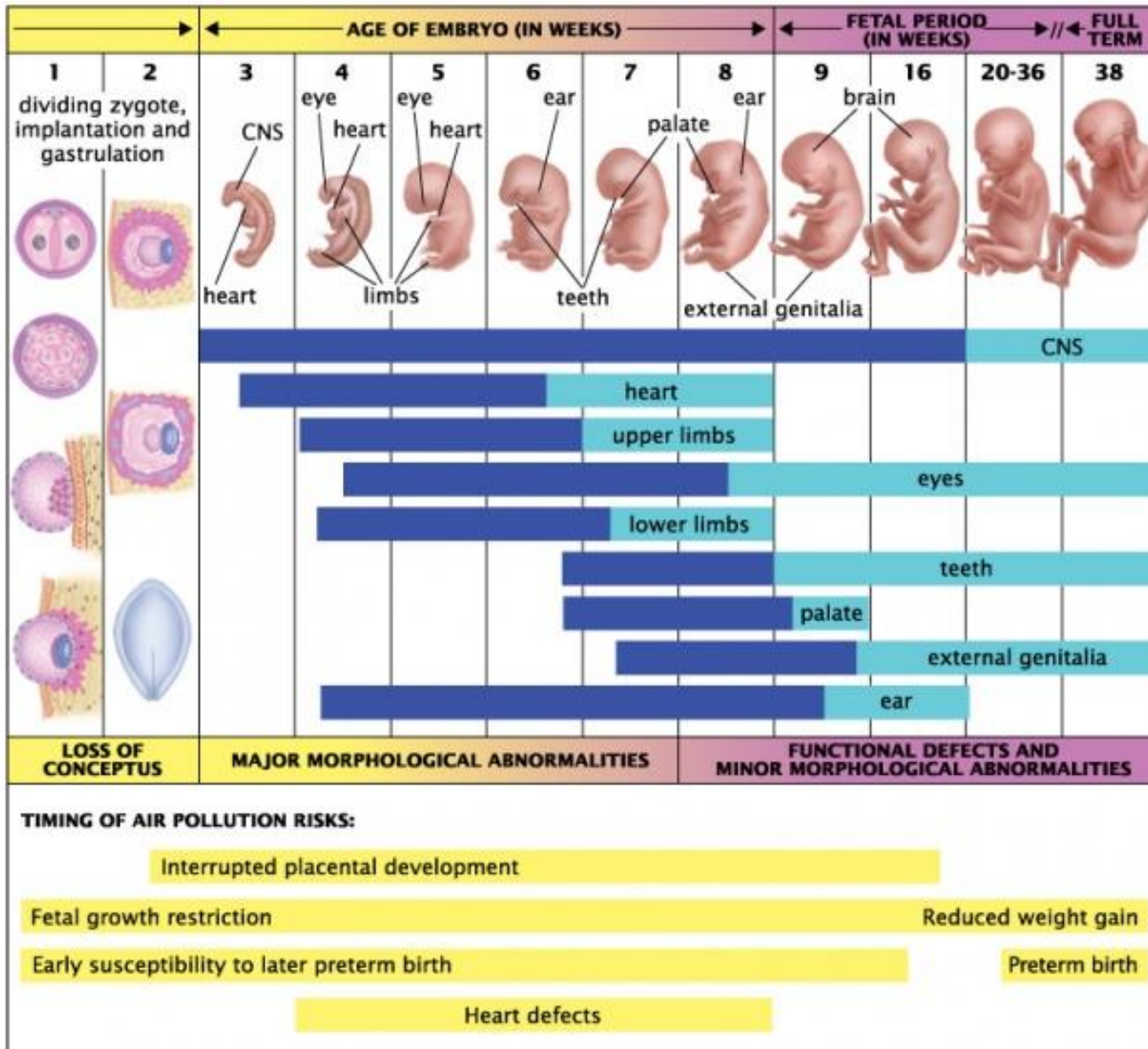
# Получение трансгенных ЖИВОТНЫХ



## 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.

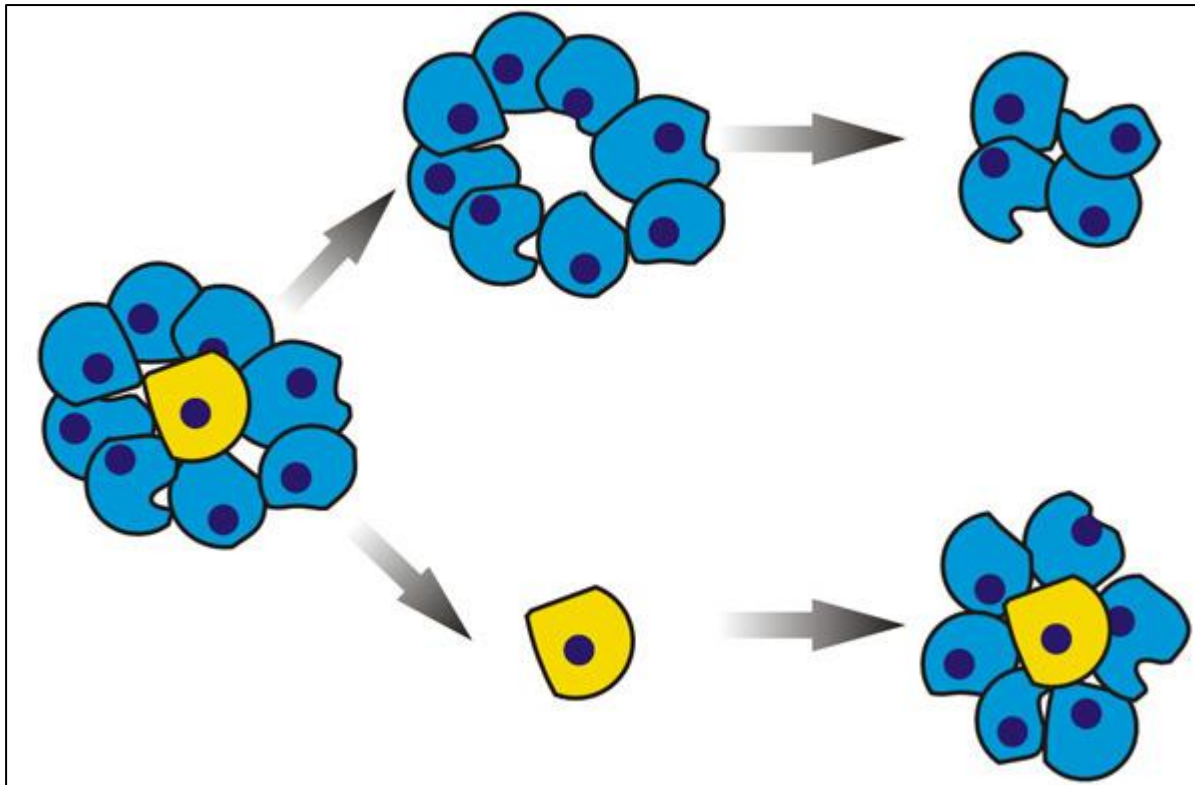


Leonard Hayflick




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](http://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**.

