Балтийский
федеральный университет
имени Иммануила Канта

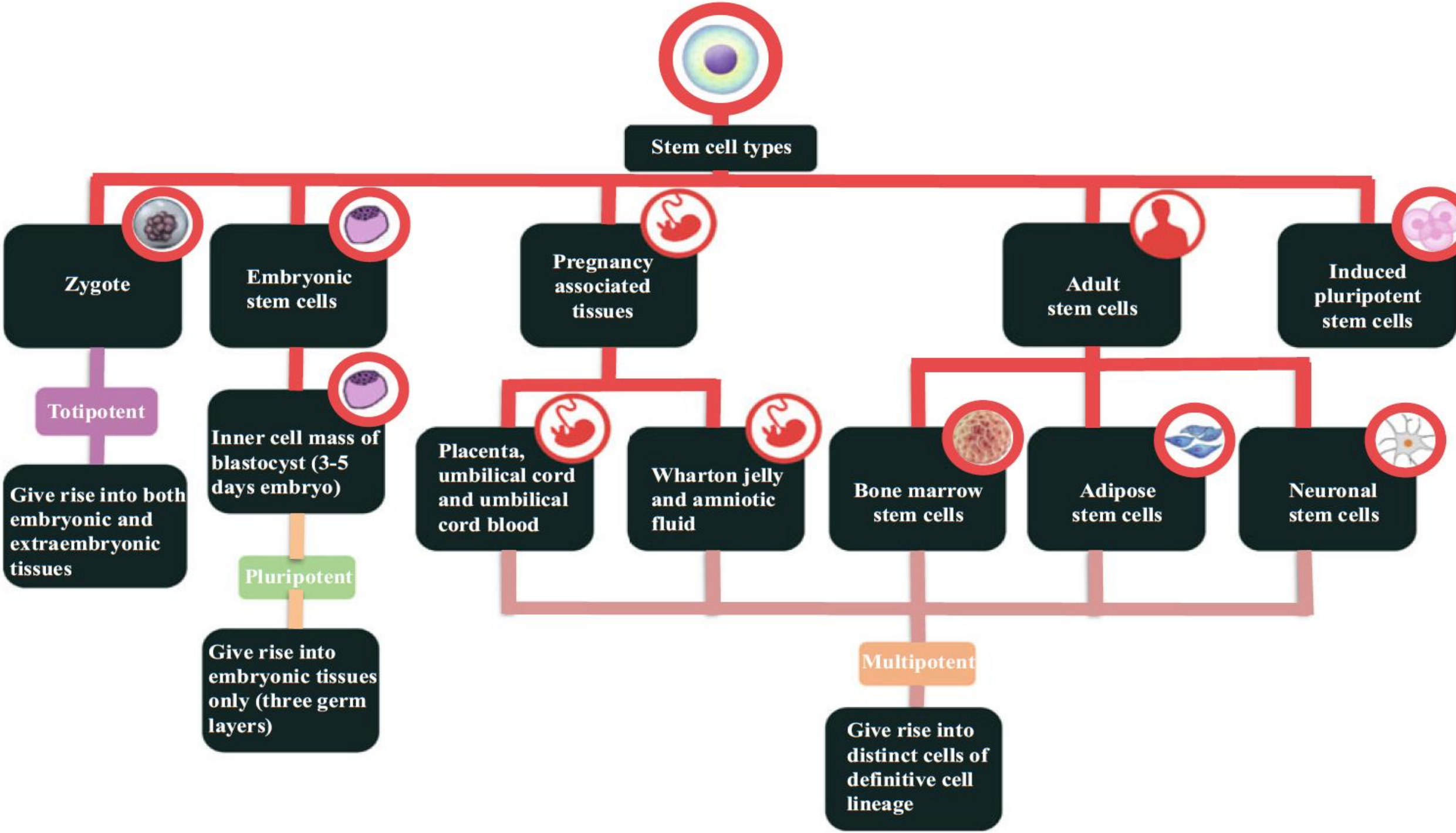
Клеточные технологии в регенеративной медицине

Хазиахматова Ольга Геннадьевна

к.б.н., старший научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий

Что такое стволовая клетка?

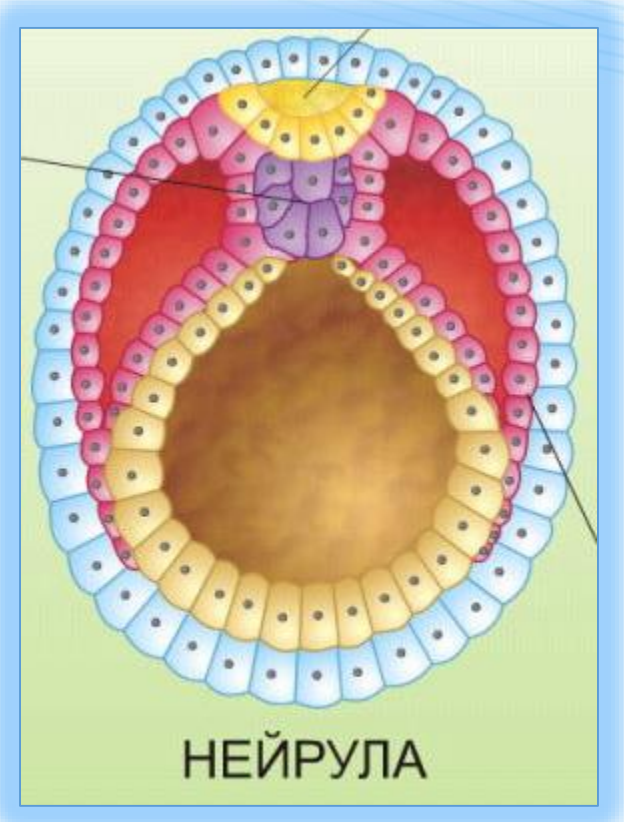
- НЕСПЕЦИАЛИЗИРОВАННАЯ
- НЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННАЯ
- САМООБНОВЛЕНИЕ
- АСИММЕТРИЧНОЕ ДЕЛЕНИЕ


Stem cell types
Zygote
Embryonic stem cells
Pregnancy associated tissues
Adult stem cells
Induced pluripotent stem cells
Totipotent
Give rise into both embryonic and extraembryonic tissues
Inner cell mass of blastocyst (3-5 days embryo)
Pluripotent
Give rise into embryonic tissues only (three germ layers)
Placenta, umbilical cord and umbilical cord blood
Wharton jelly and amniotic fluid
Bone marrow stem cells
Adipose stem cells
Neuronal stem cells
Multipotent
Give rise into distinct cells of definitive cell lineage

Происхождение

ТИП КЛЕТОК	ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ	ВЗРОСЛЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ	ИПСК
ПОЛУЧЕНИЕ	Клетки внутренней клеточной массы бластоциста	Мультипотентные клетки из тканей взрослого человека	Соматические клетки перепрограммированные в эмбриональные плюрипотентные стволовые клетки
САМООБНОВЛЕНИЕ	Высокое	Ограниченное	Высокое
ПОТЕНТНОСТЬ	Плюрипотентность	Мультипотентность	Плюрипотентность
ДИФФЕРЕНЦИРОВКА	Может дифференцироваться на клетки трех зародышевых листков	Ограниченные линии дифференцировки (в рамках одного зародышевого листка)	Может дифференцироваться в клетки каждого из трех зародышевых листков
СПОНТАННАЯ ОНКОГЕННАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ	Присутствует	Отсутствует	Присутствует
ЭТИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ	Да	Нет	Минимальные

ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬ

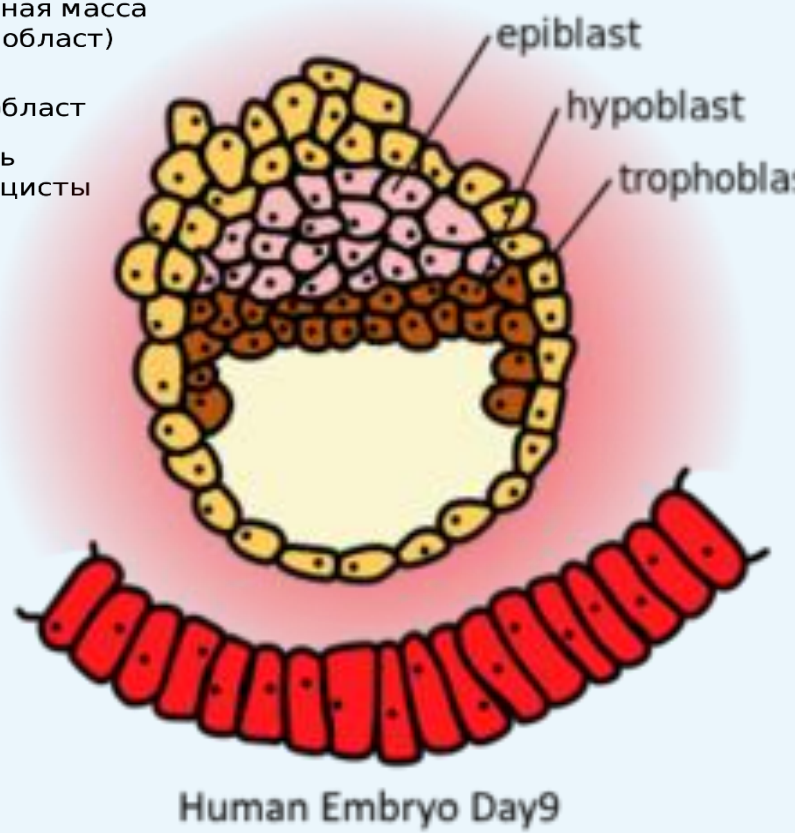


ЭКТОДЕРМА	Эпидермис кожи, железы кожи, волосы, ногти, нервная система
МЕЗОДЕРМА	Мышечные, соединительные ткани, мочевыделительная система, половая система, хорда
ЭНТОДЕРМА	Эпителий ЖКТ и дыхательной системы, пищеварительные железы

Типы плюрипотентных стволовых клеток

БФУ им. И. Канта

- Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК, ESC)
- Стволовые клетки эпибласта (EpiSCs)
- Эмбриональные половые клетки (Гоноцит, EGCs)
- Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК, IPS)



Эмбриональные стволовые клетки человека

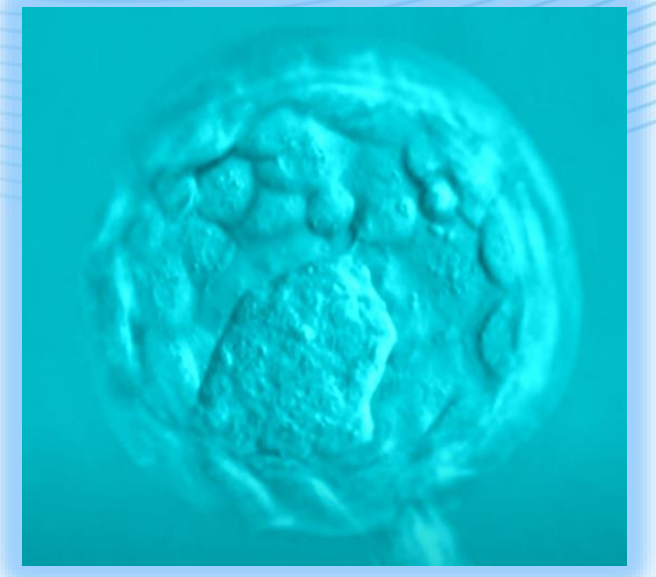
Выделение

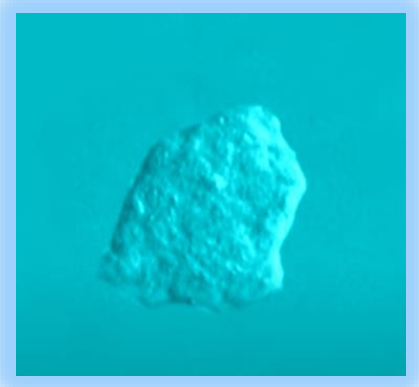
БФУ им. И. Канта

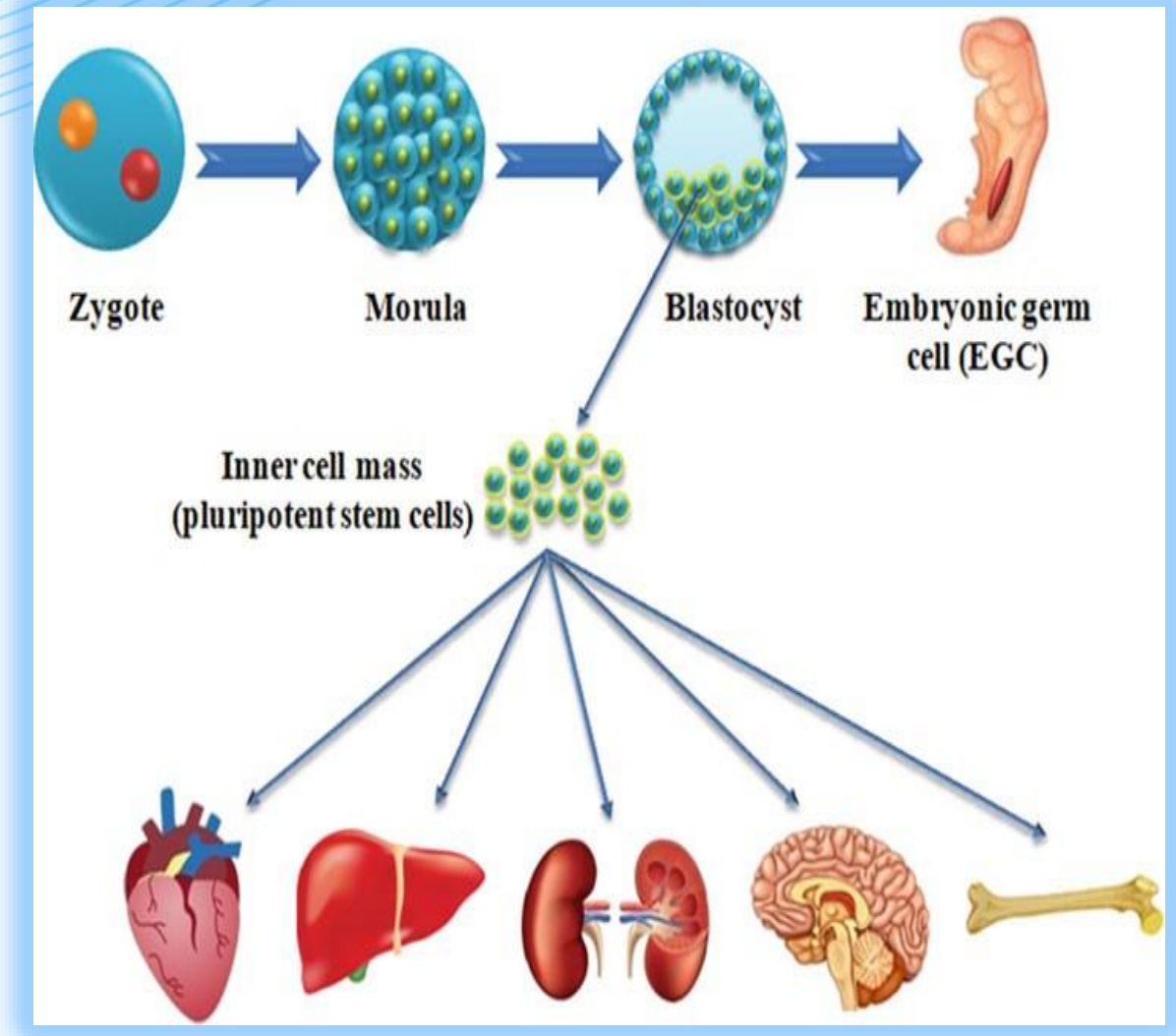
ИММУНОХИРУРГИЯ

МЕХАНИЧЕСКОЕ

ЛАЗЕРНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ





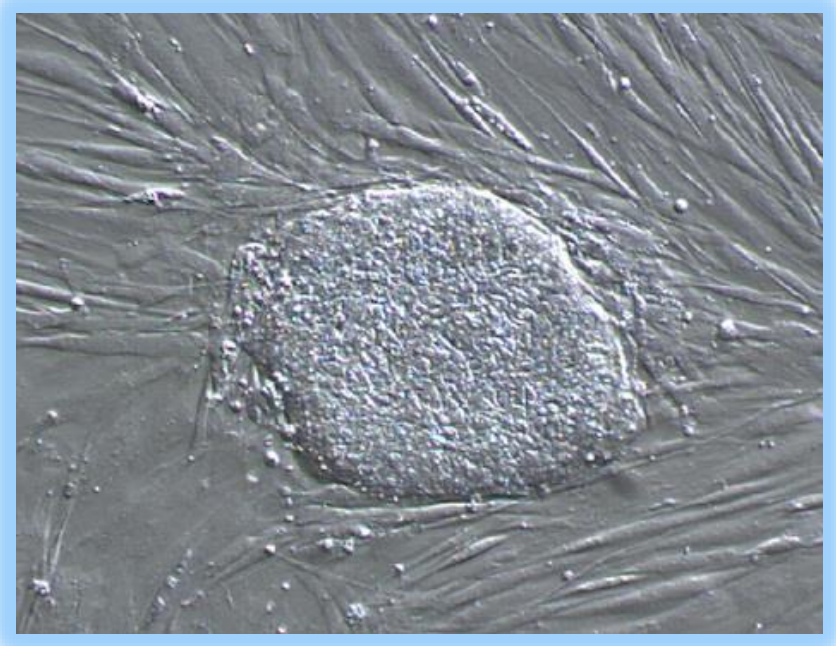


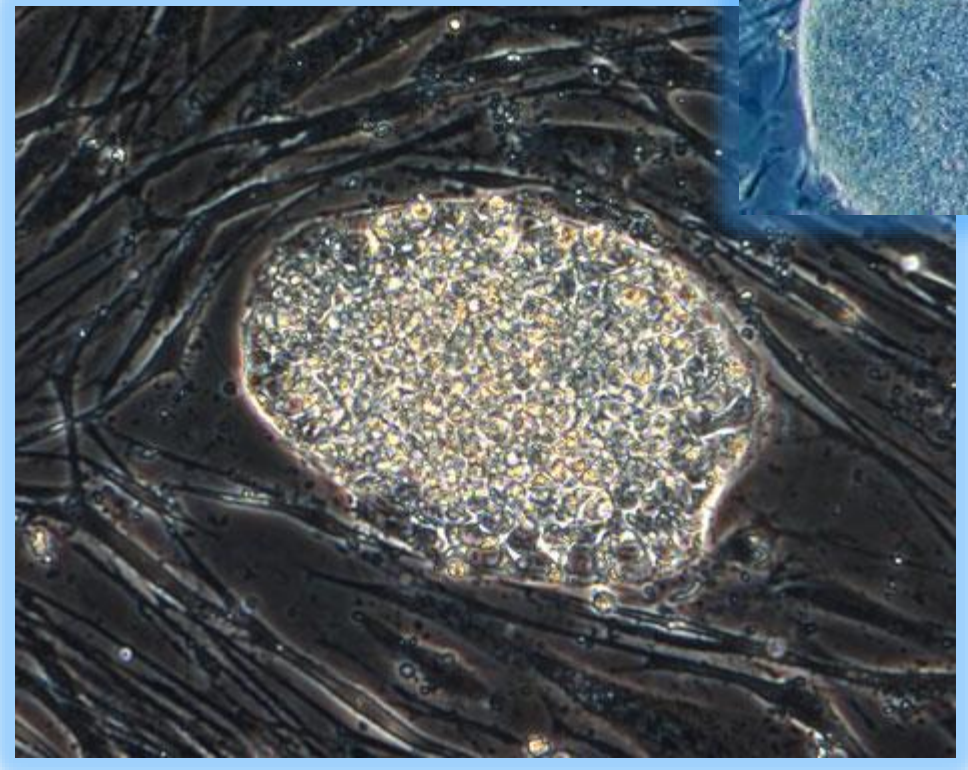
Эмбриональные стволовые клетки человека

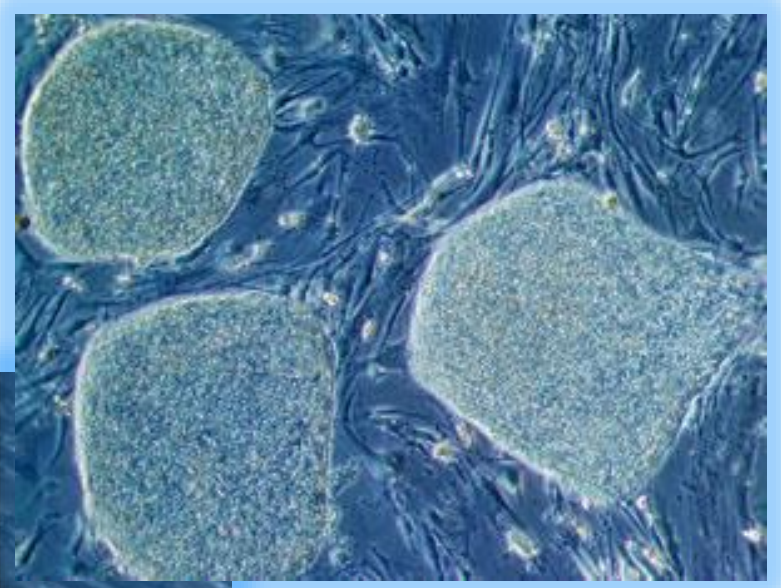
Культивирование

Слой питательных клеток

Обогащенная ростовыми факторами питательная среда



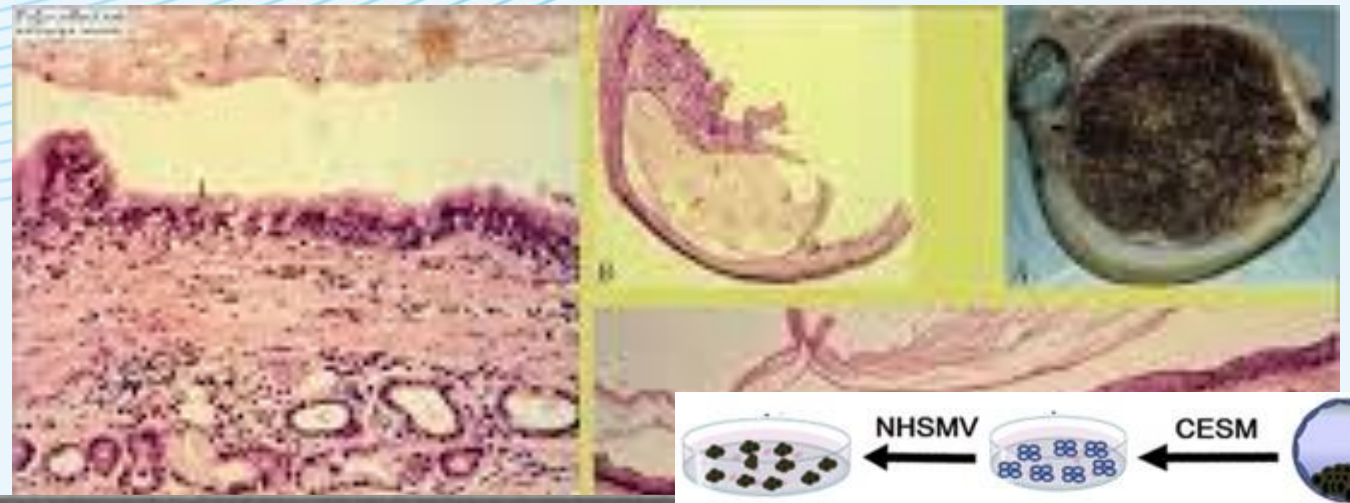




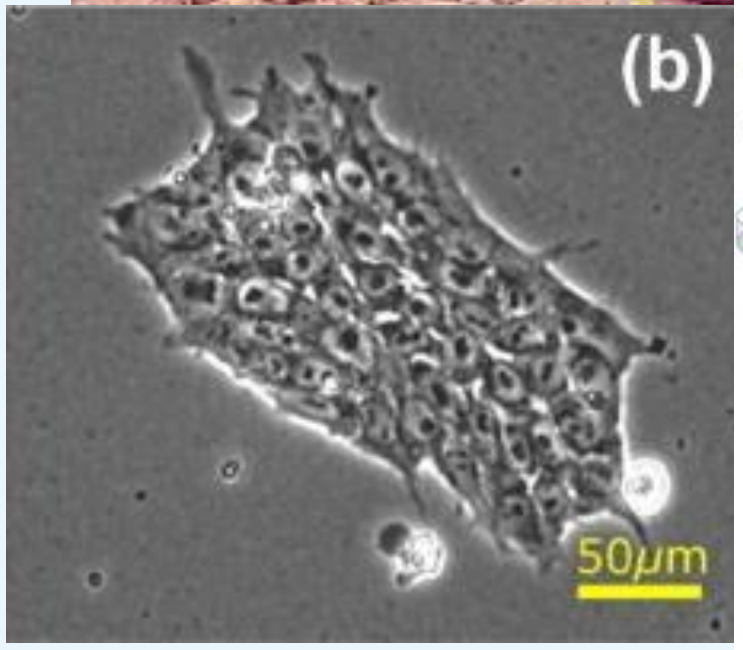
Эмбриональные стволовые клетки человека

Характеристики

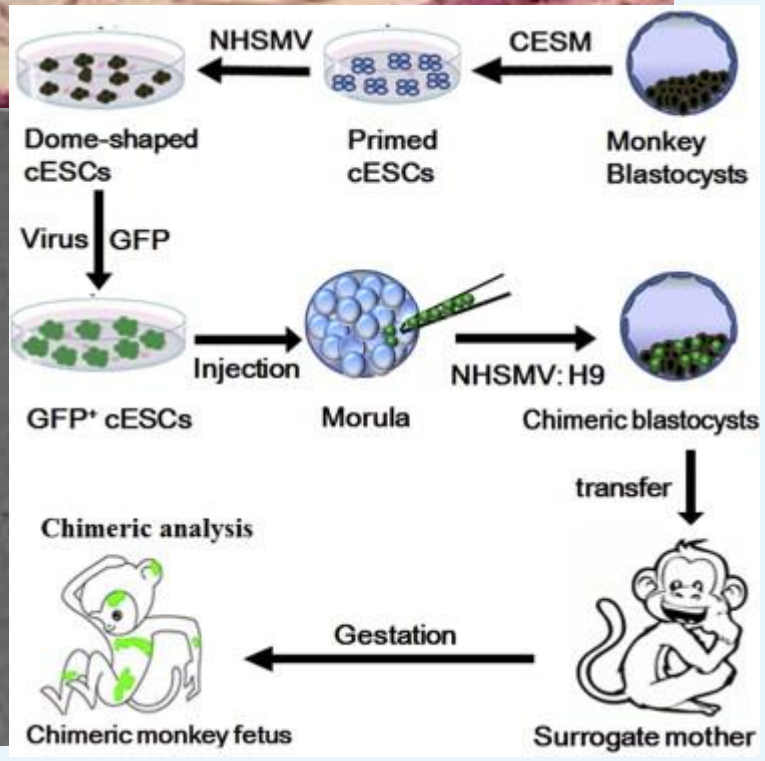
Тератомы



Гомогенные колонии округлой формы



Образование химер



Эмбриональные стволовые клетки человека

Дифференцировка

ПЛОТНОСТЬ ПОСЕВА

РН

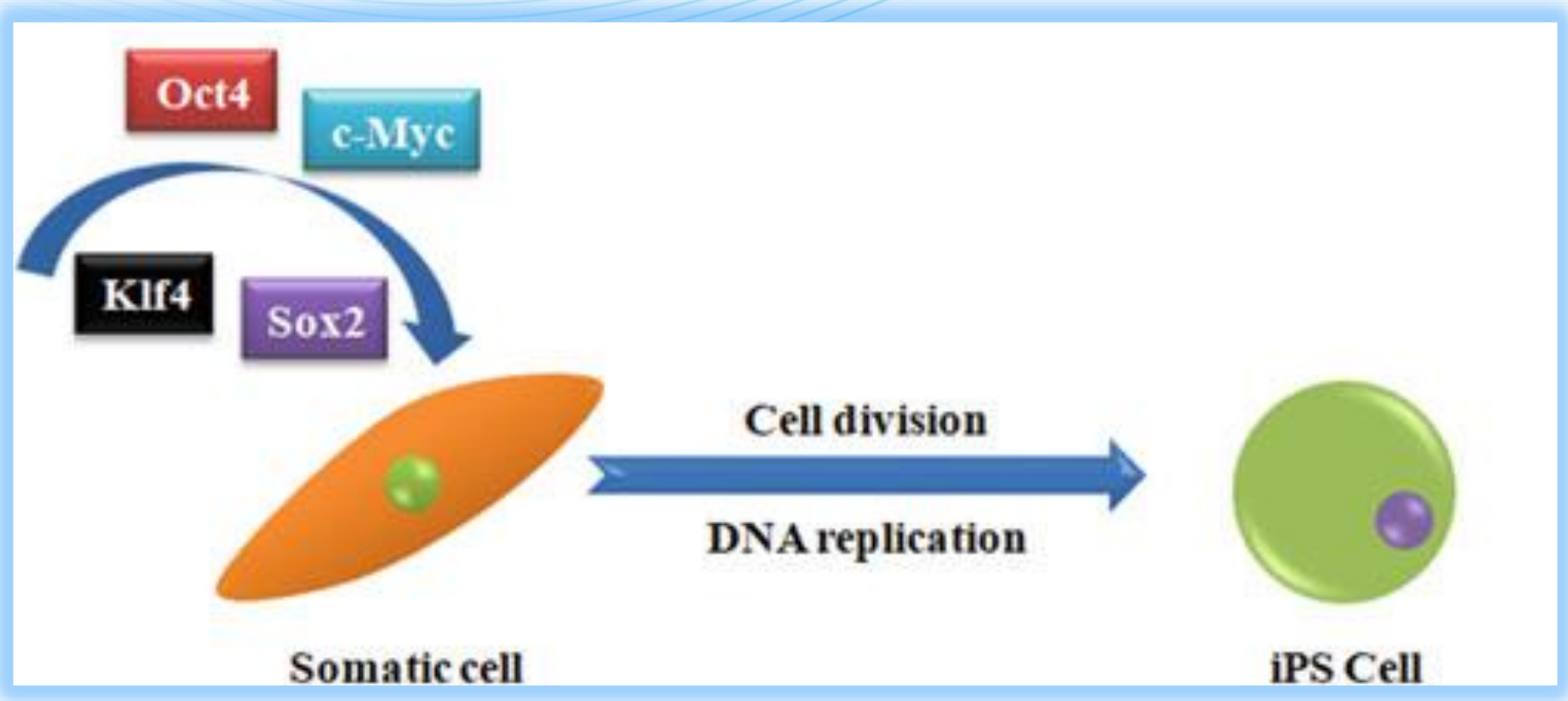
ТЕМПЕРАТУРА

КОМПОНЕНТЫ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ

ФАКТОРЫ РОСТА

Маркер	Тип	Роль в плюрипотентности
Oct-4	Фактор транскрипции семейства POU (гомеодоменный белок)	Поддерживает самообновление и плюрипотентность. Паттерны транскрипции играют роль в определении идентичности ESC. Oct-4 / SOX-2 комплекса, играют фундаментальную роль в экспрессии генов и регуляторном контроле в ЭСК
Sox-2	Фактор транскрипции HMG-box	
Nanog	Гомеодоменные белки	
SSEA- 3	Гликолипидные углеводные антигены	Антигены специфически экспрессируются на ESC, EGC и клетках тератокарциномы человека. Любое снижение экспрессии этих антигенов связано с моделями дифференцировки и развитием.
SSEA- 4	Гликолипидные углеводные антигены	
TRA- 1-60	Кератансульфат-родственные антигены	
TRA- 1-81	Кератансульфат-родственные антигены	

Индукция плюрипотентности

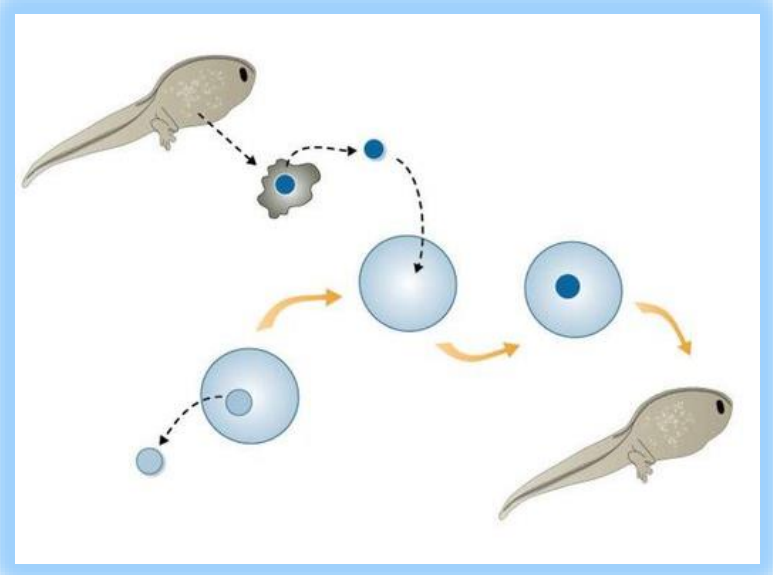


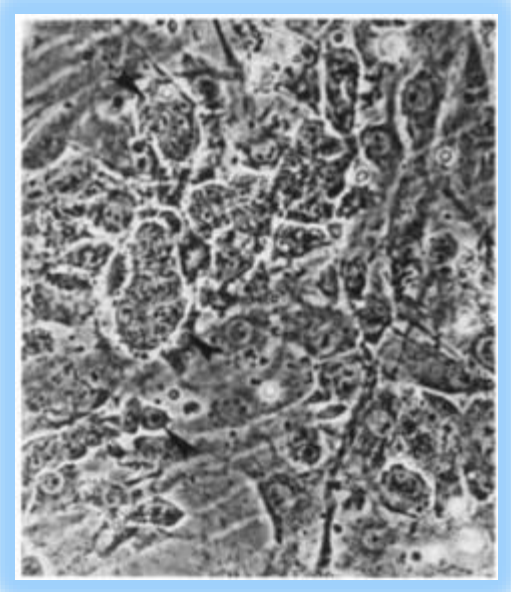
Репрограммирование клеток

John B. Gurdon
1962 г.
ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ЯДРА
somatic cell nuclear transfer
SCNT

Ian Wilmut
1996 г.
КЛОНИРОВАНИЕ МЛЕКОПИТАЮЩЕГО

Martin Evans, Matthew Kaufman Gail Martin
1981
КЛЕТОЧНАЯ ЛИНИЯ
embryonic stem cell (ESC)

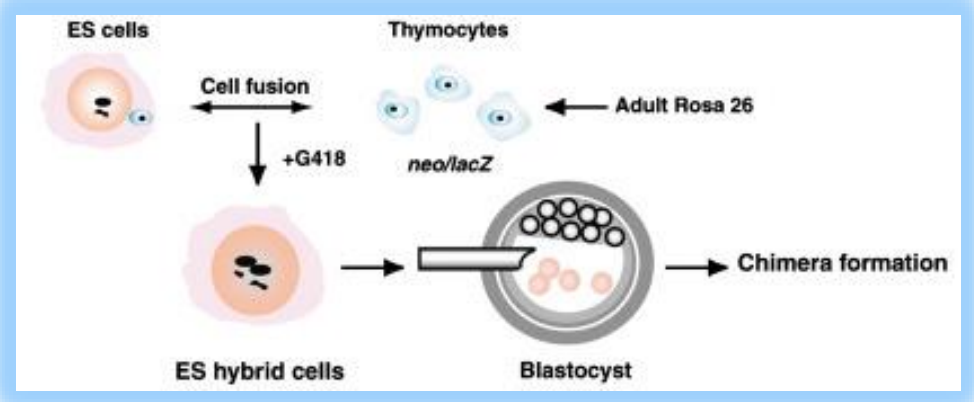


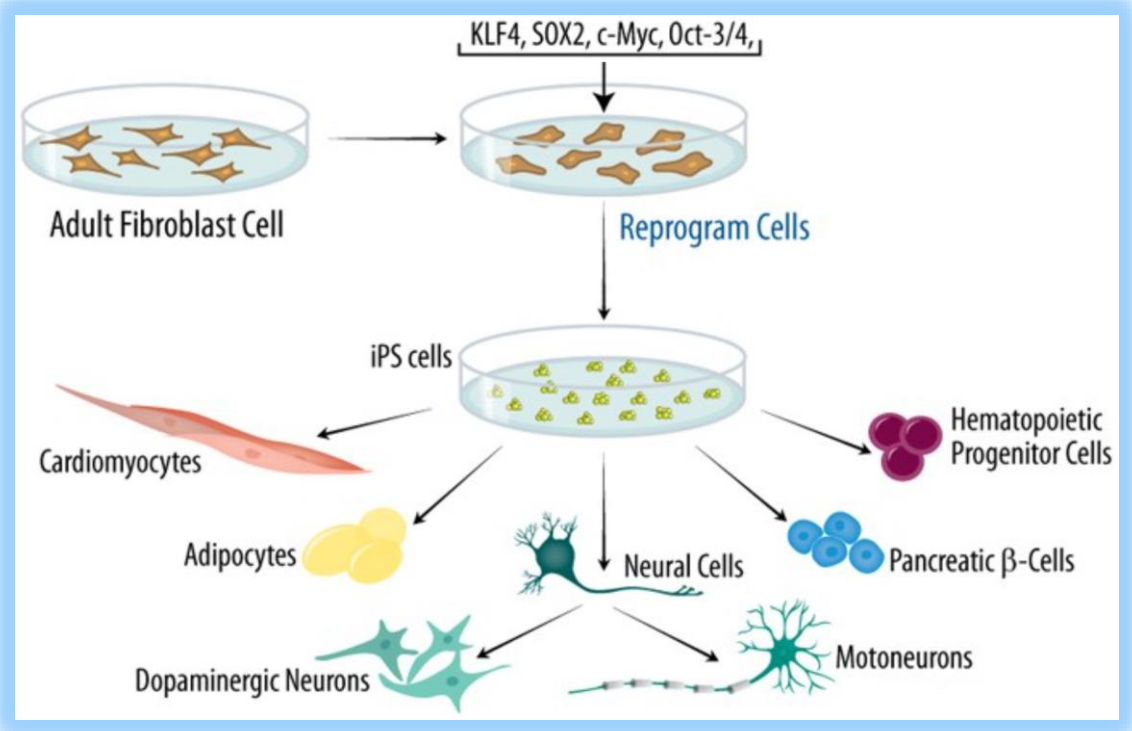


Репрограммирование клеток

Takashi Tada
2001 г.
СЛИЯНИЯ КЛЕТОК

Shinya Yamanaka
2006г.
ИПСК
iPS (induced pluripotent stem) cells

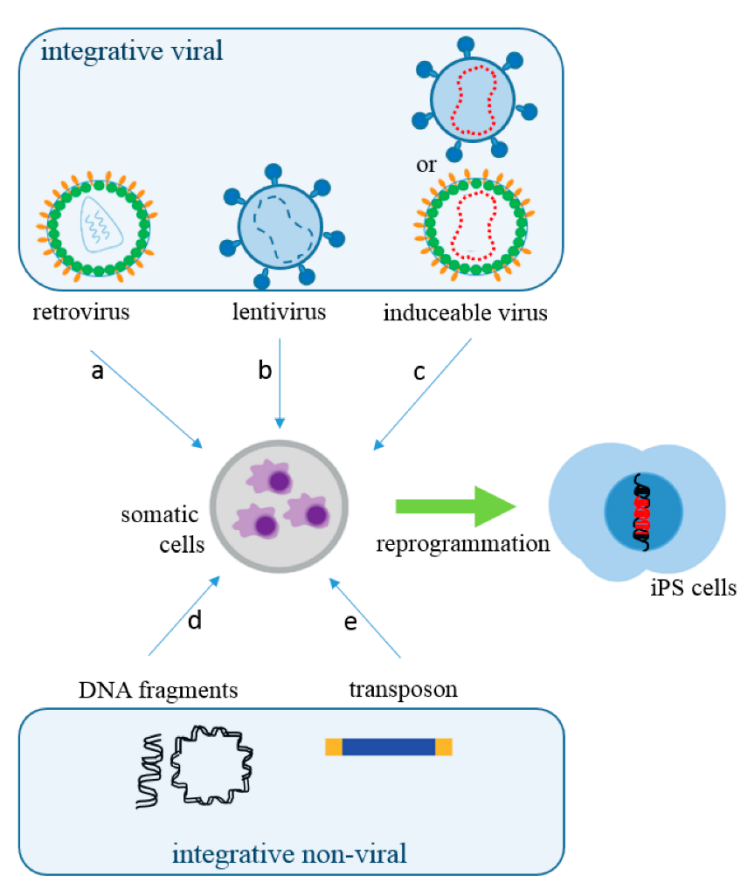


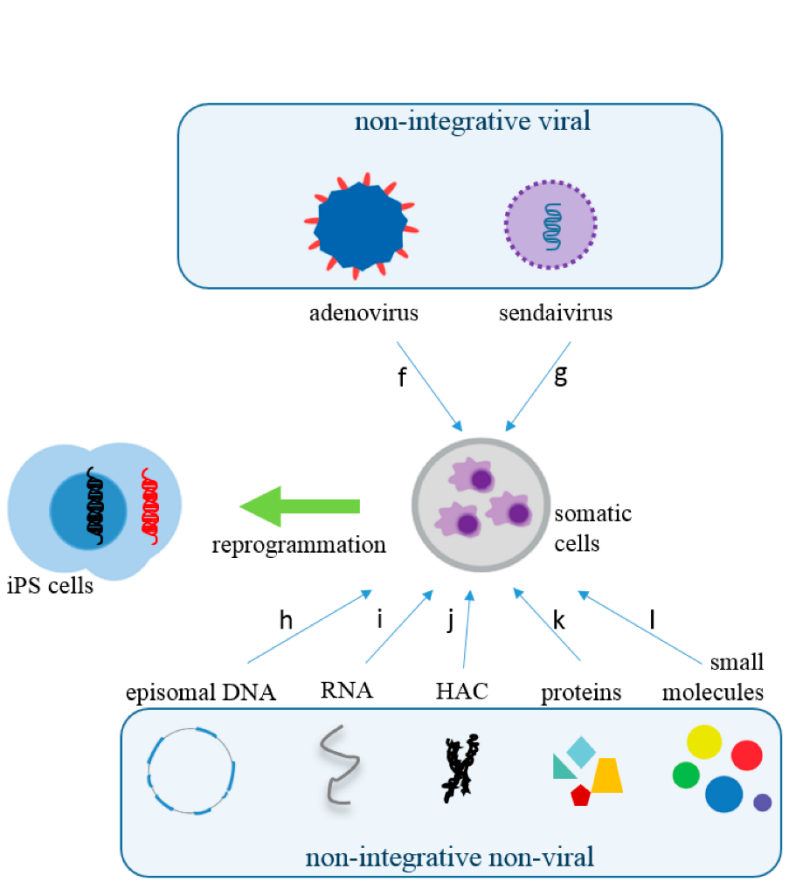


Индукция плюрипотентности

ИНТЕГРАТИВНЫЕ МЕТОДЫ

НЕИНТЕГРАТИВНЫЕ МЕТОДЫ





Индукция плюрипотентности

РИСКИ

повышение экспрессии генов, связанных с раком

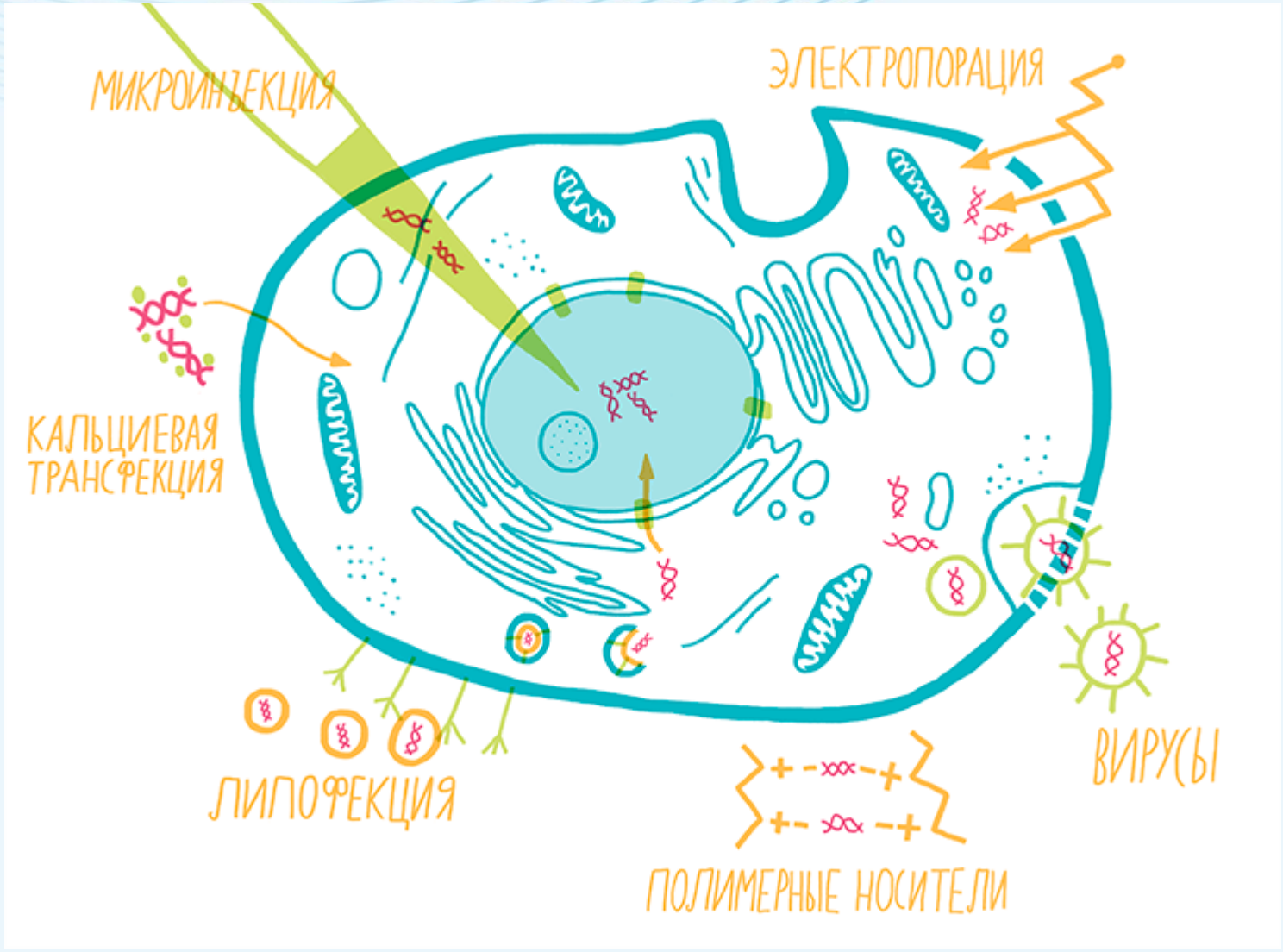
делеция одного или нескольких онкогенов после индукции плюрипотентности

создания более 3 месяцев

регенеративная медицина

Индукция плюрипотентности

Методы



Плюрипотентные стволовые клетки с расширенным потенциалом (EPSCs)

2017 год – мыши
2019 год – свиньи, люди

тотипотентные стволовые клетки

nature cell biology

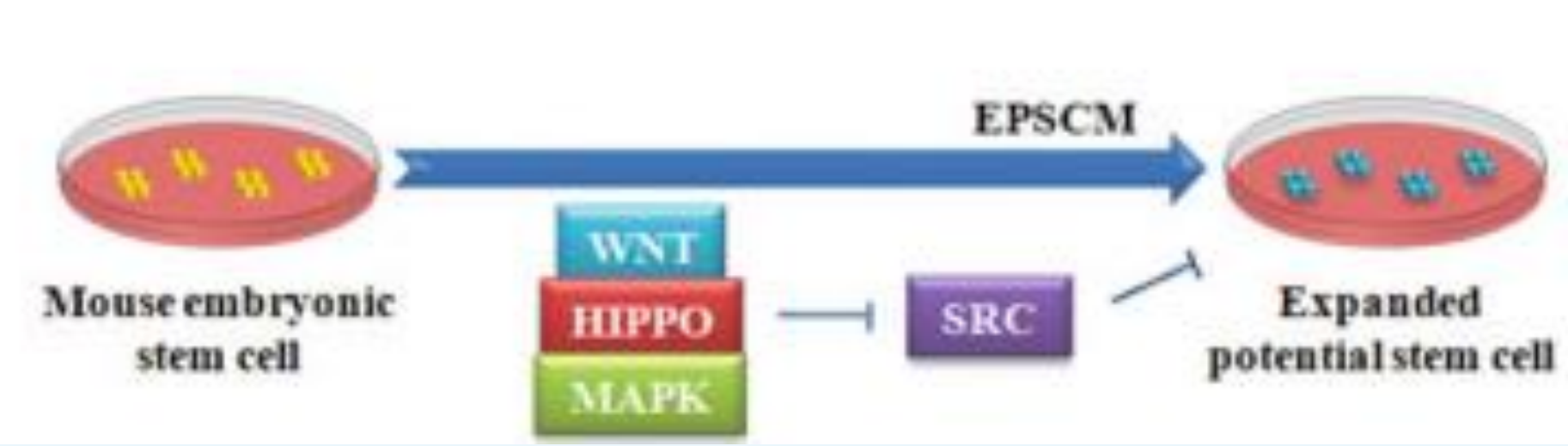
ARTICLES

https://doi.org/10.1038/s41556-019-0333-2

Establishment of porcine and human expanded potential stem cells

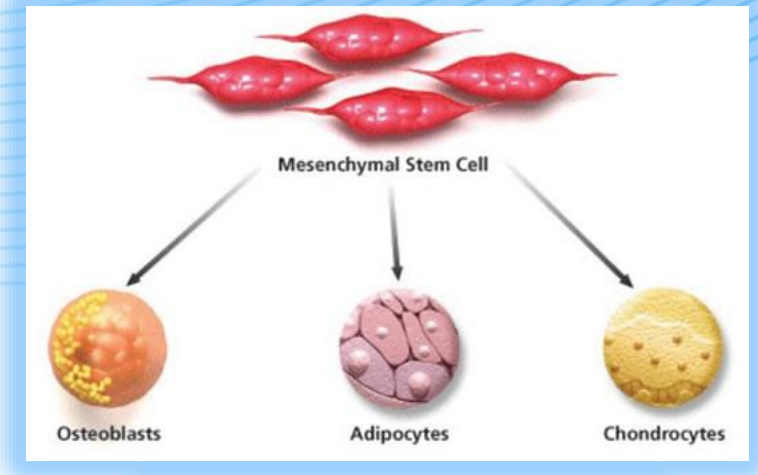
Xuefei Gao[1,2,23], Monika Nowak-Imialek[3,4,23], Xi Chen[2,23], Dongsheng Chen[5,6], Doris Herrmann[3,4], Degong Ruan[1,7], Andy Chun Hang Chen[8], Melanie A. Eckersley-Maslin[9], Shakil Ahmad[10], Yin Lau Lee[8], Toshihiro Kobayashi[11], David Ryan[2], Jixing Zhong[5,6], Jiacheng Zhu[5,6], Jian Wu[1], Guocheng Lan[12], Stoyan Petkov[3,4,20], Jian Yang[2,21], Liliana Antunes[2], Lia S. Campos[2], Beiyuan Fu[2], Shengpeng Wang[5,6], Yu Yong[2], Xiaomin Wang[7], Song-Guo Xue[13], Liangpeng Ge[14], Zuohua Liu[14], Yong Huang[14], Tao Nie[7], Peng Li[7], Donghai Wu[7], Duanqing Pei[7,15], Yi Zhang[16], Liming Lu[17], Fengtang Yang[2], Susan J. Kimber[18], Wolf Reik[9], Xiangang Zou[12], Zhouchun Shang[5,6], Liangxue Lai[7], Azim Surani[11], Patrick P. L. Tam[19], Asif Ahmed[10], William Shu Biu Yeung[8], Sarah A. Teichmann[2], Heiner Niemann[3,4,22*] and Pentao Liu[1,2*]

We recently derived mouse expanded potential stem cells (EPSCs) from individual blastomeres by inhibiting the critical molecular pathways that predispose their differentiation. EPSCs had enriched molecular signatures of blastomeres and possessed developmental potency for all embryonic and extra-embryonic cell lineages. Here, we report the derivation of porcine EPSCs which express key pluripotency genes, are genetically stable, permit genome editing, differentiate to derivatives of the three germ layers in chimeras and produce primordial germ cell-like cells in vitro. Under similar conditions, human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells can be converted, or somatic cells directly reprogrammed, to EPSCs that display the molecular and functional attributes reminiscent of porcine EPSCs. Importantly, trophoblast stem-cell-like cells can be generated from both human and porcine EPSCs. Our pathway-inhibition paradigm thus opens an avenue for generating mammalian pluripotent stem cells, and EPSCs present a unique cellular platform for translational research in biotechnology and regenerative medicine.

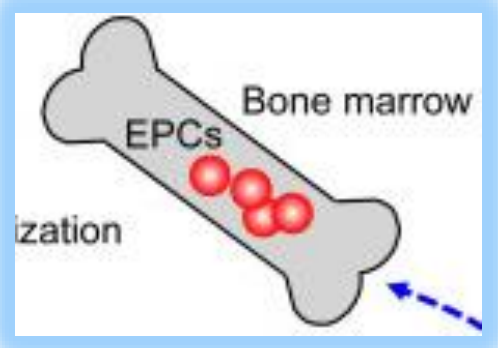


Соматические или взрослые стволовые клетки

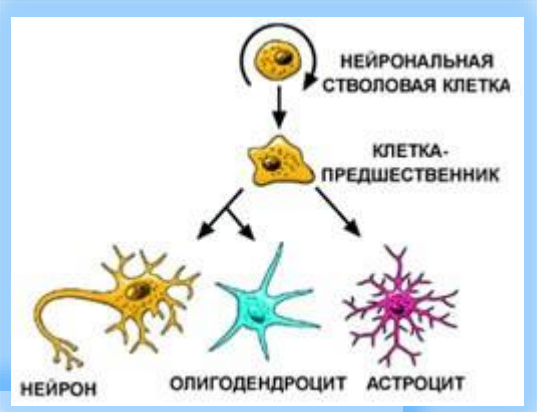
Мезенхимальные стволовые клетки (МСК)



Эндотелиальные стволовые клетки-предшественники (EPC)

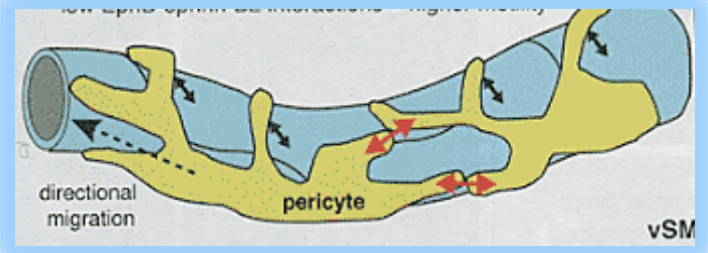


Нервные стволовые клетки (НСК)



Периваскулярные клетки (PC)

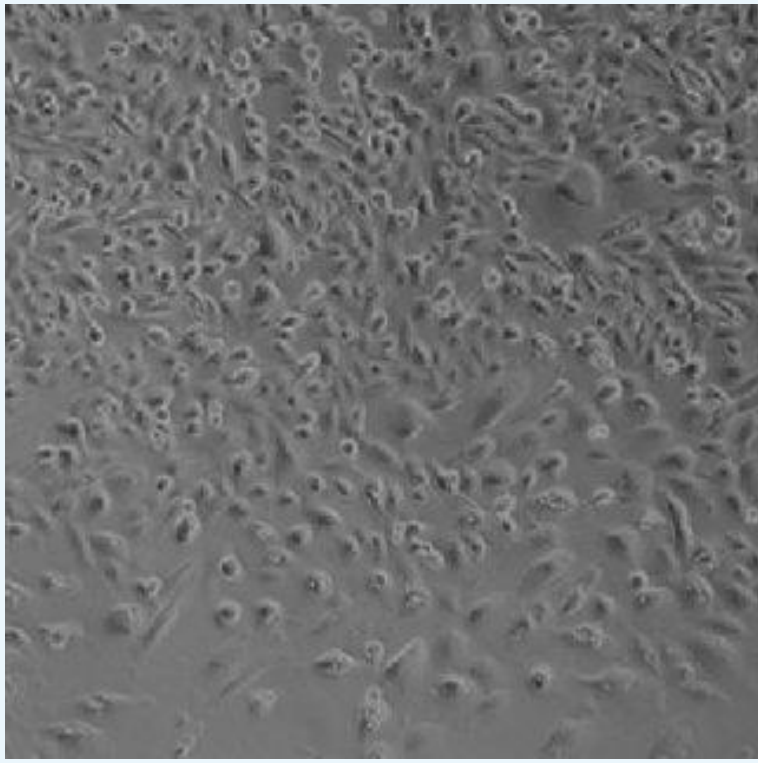
Гематопоэтические стволовые клетки (HSC)



Эндотелиальные стволовые клетки-предшественники (EPC)

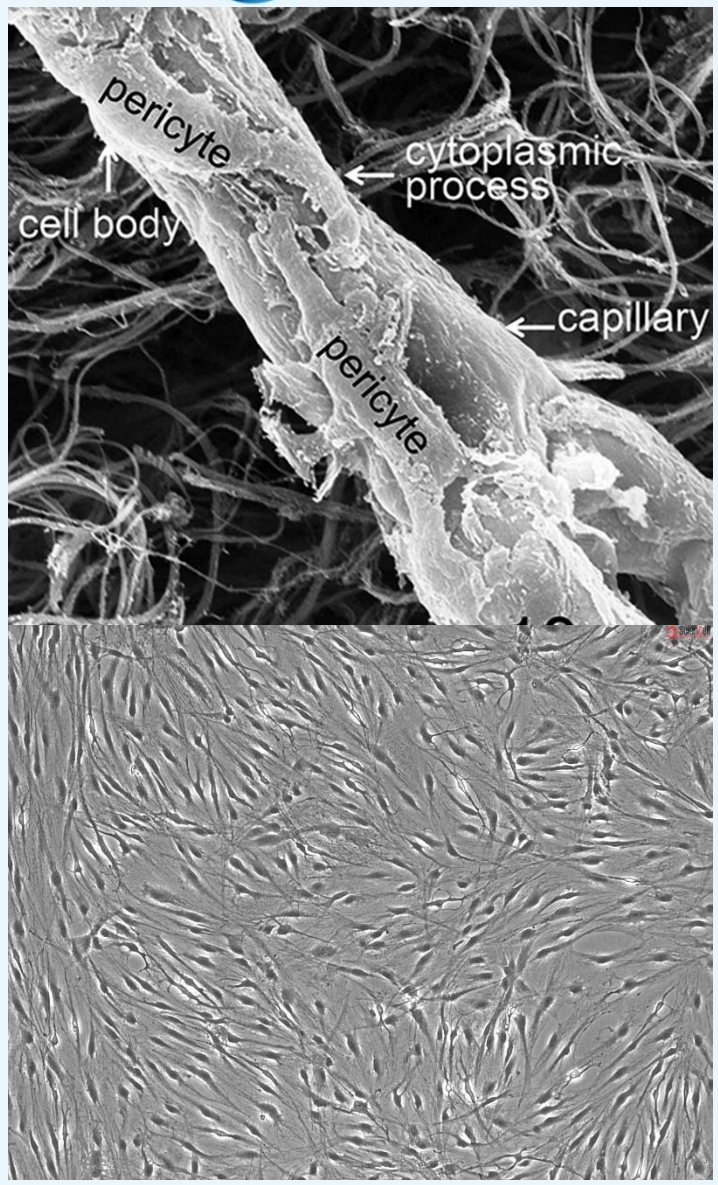
БФУ им. И. Канта

- клоногенность, самообновление и потенциал дифференцировки
- CD34, CD146, CD45, CD115, CD14, CD133, VEGFR1, VEGFR2 (или KDR)
- Формирование новых кровеносных сосудов
- средство регенерации эндотелия
- биологические маркеры сосудистой функции



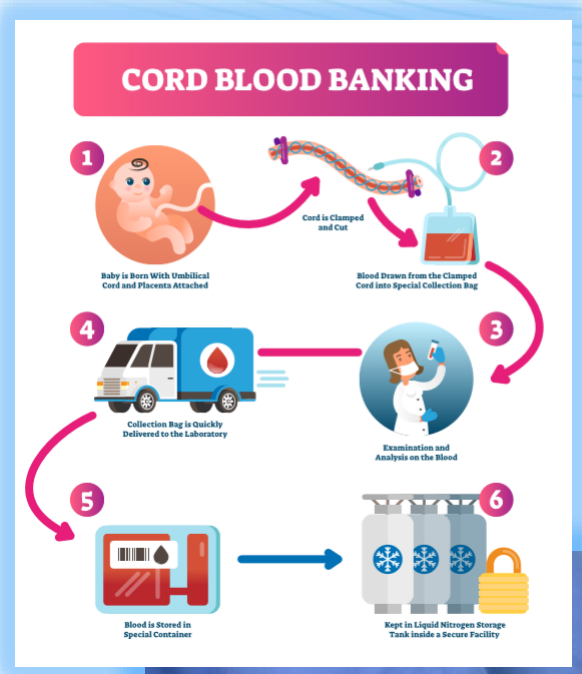
Перициты

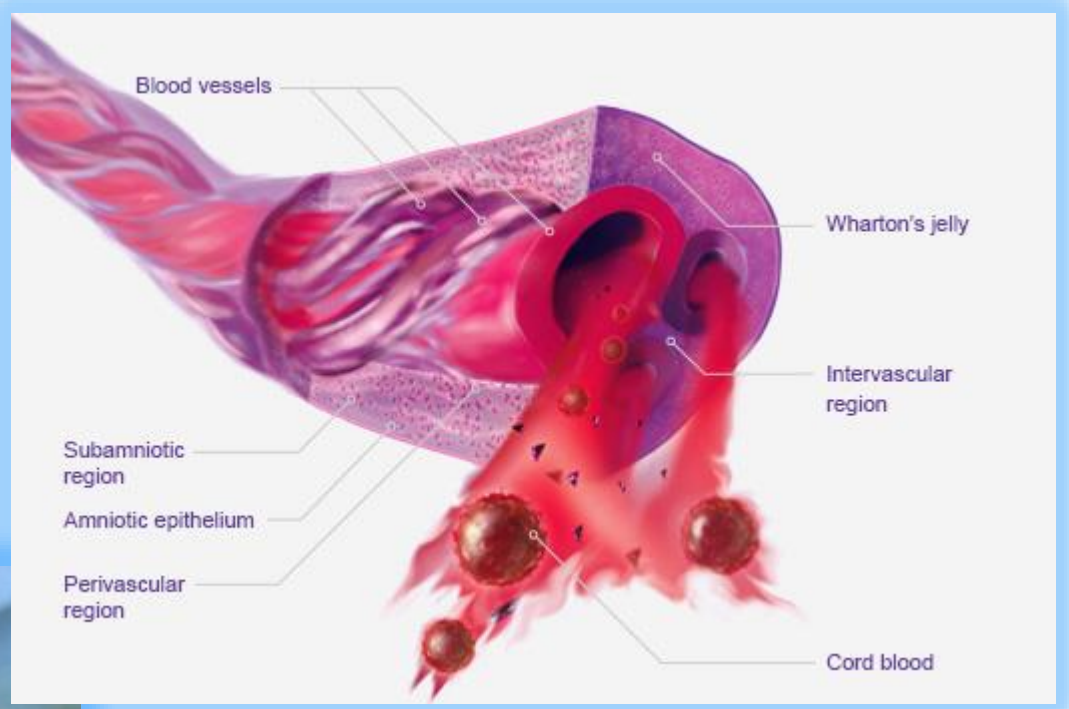
- располагаются вокруг эндотелия микрососудистых капилляров
- Ангиогенез
- Инициирование неоваскуляризации
- Регуляция кровотока
- Дифференцировка: адипоциты, остеобласты, хондробласты, фибробласты, гладкомышечные клетки и нервные клетки



Стволовые клетки пуповинной крови человека (UCB)

БФУ им. И. Канта

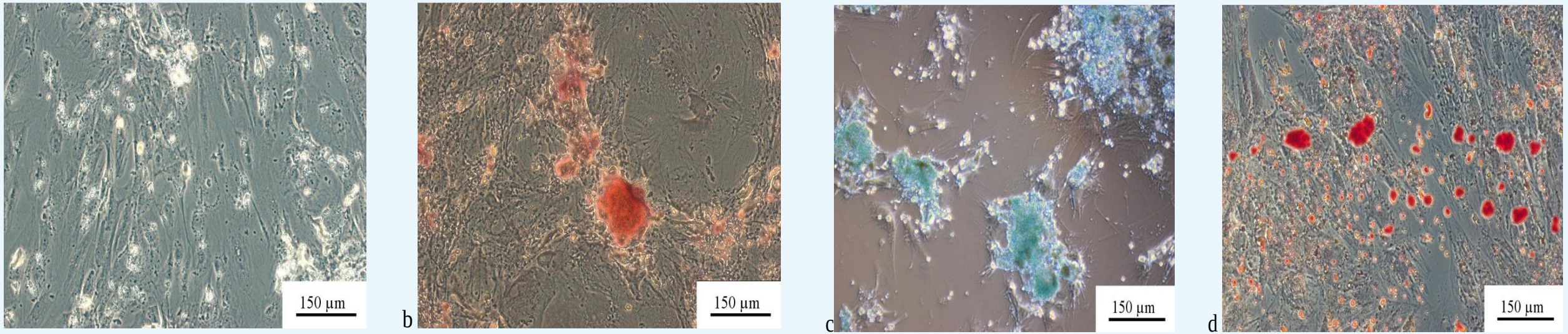




Мезенхимальные стромальные клетки (МСК)

БФУ им. И. Канта

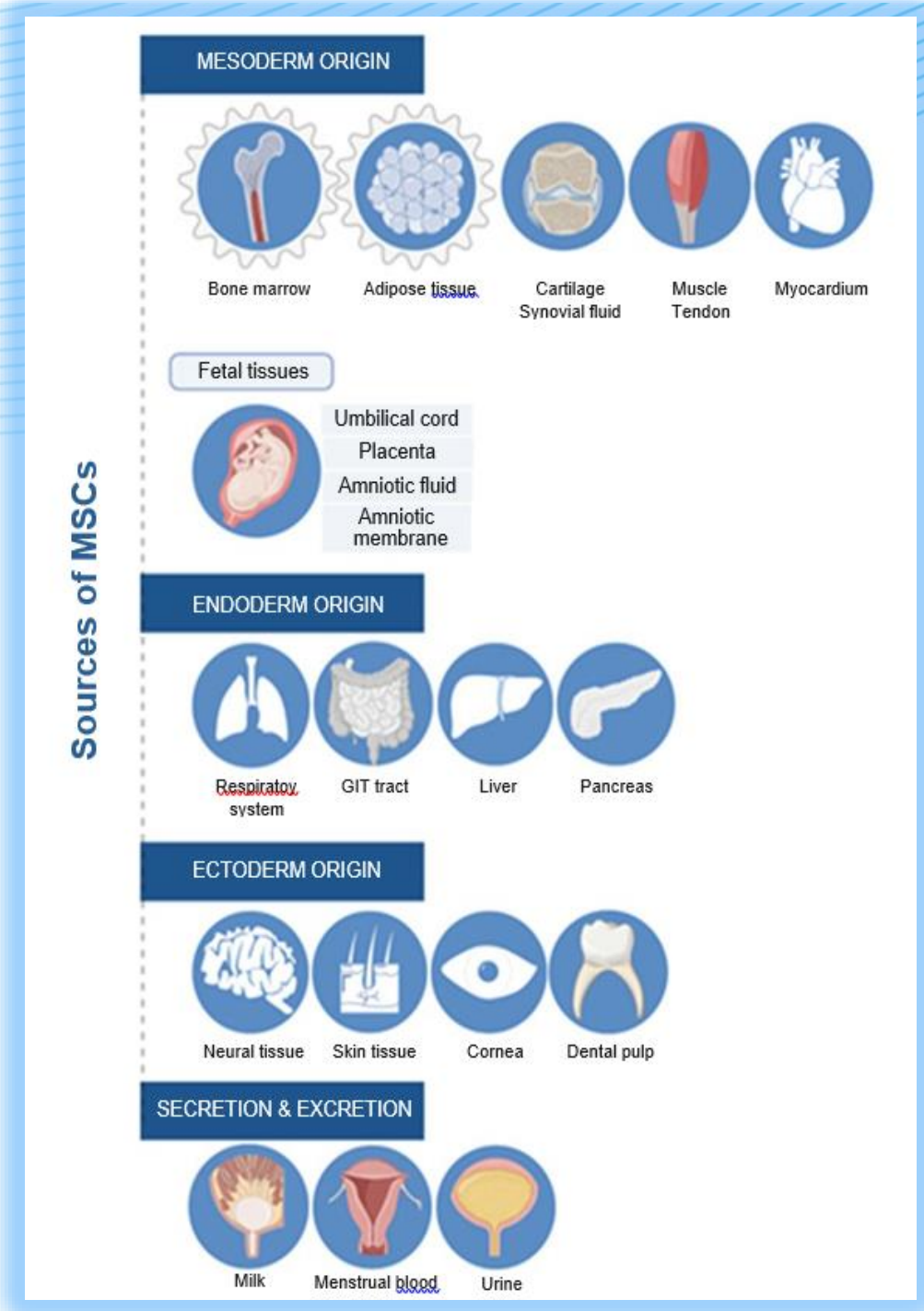
МСК обычно располагаются в периваскулярной нише, что позволяет им быть более динамичными и легко мигрировать внутри системы кровообращения к поврежденным тканям для поддержания и восстановления.



МСК

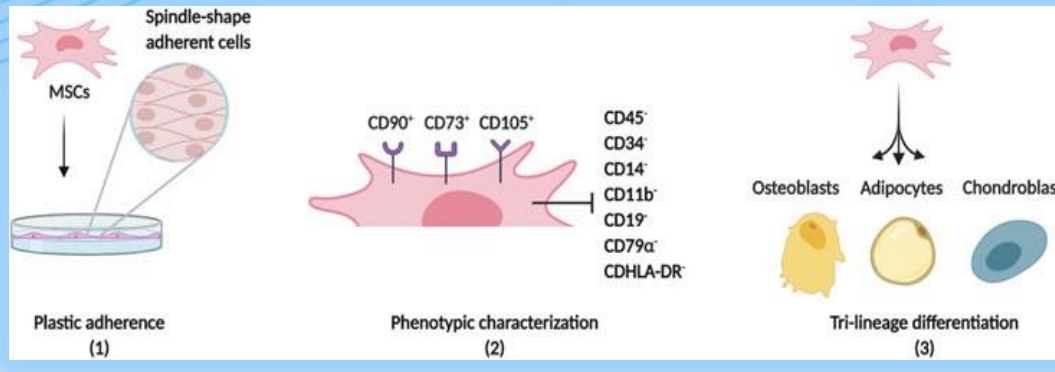
Источники

- BM-MSCs
- AD-MSCs
- UC-MSC



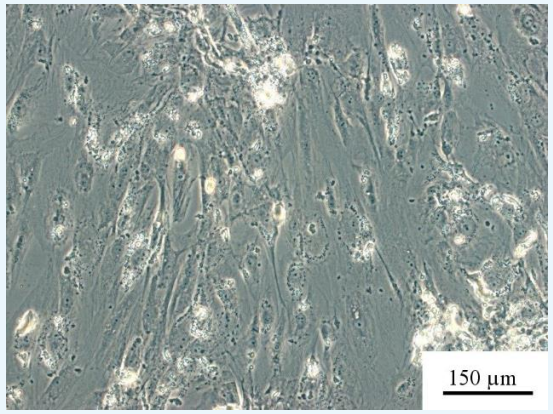
МСК
Характеристика

БФУ им. И. Канта

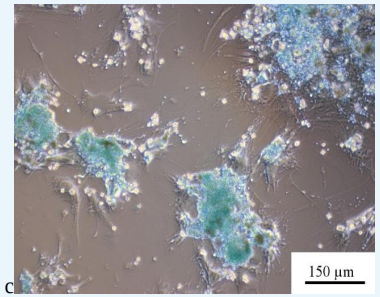


Трехлинейная дифференцировка

Адгезия к пластику

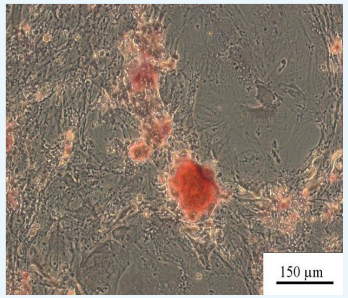


a

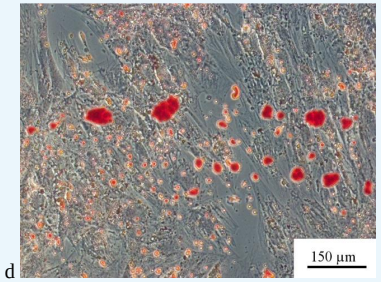


c

хондрогенная среда, гликопротеины, окрашенные Alcian Blue



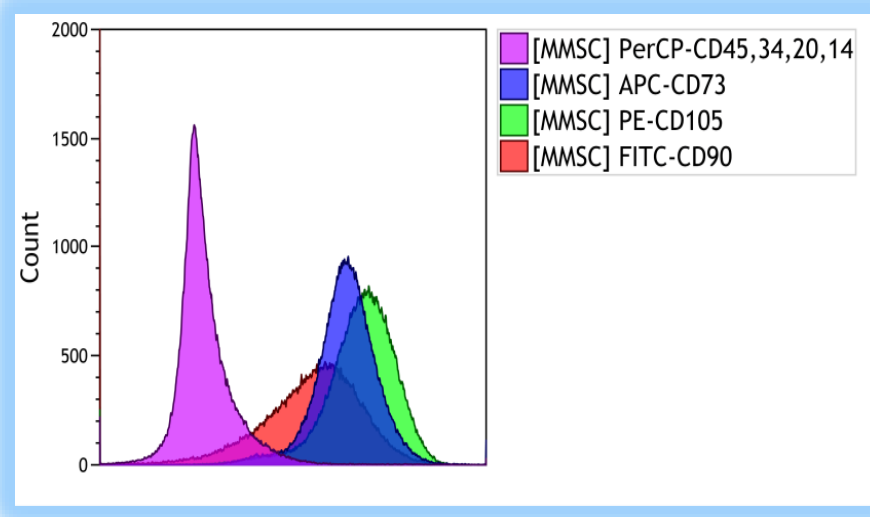
остеогенная среда, области с минерализованным межклеточным веществом окрашены Alisarine Red



d

адипогенная среда, нейтральные триглицериды с окраской Oil Rad и липиды

Экспрессия маркеров



МСК

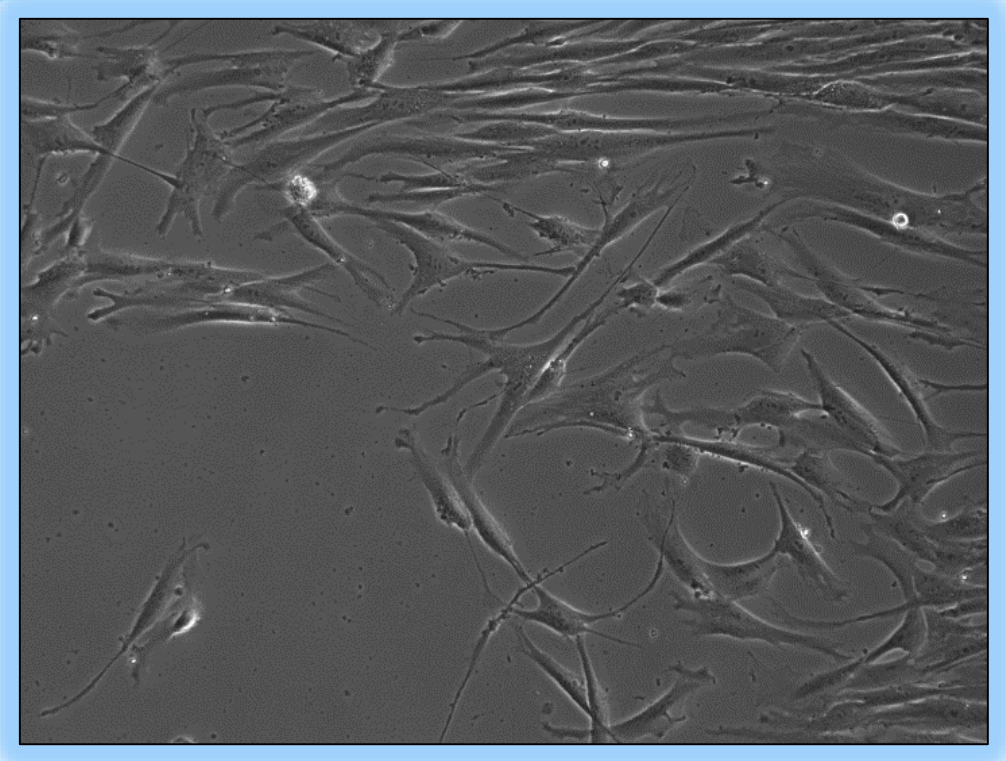
Биологические функции

Ограниченное количество митотических делений

Миграция и хоуминг

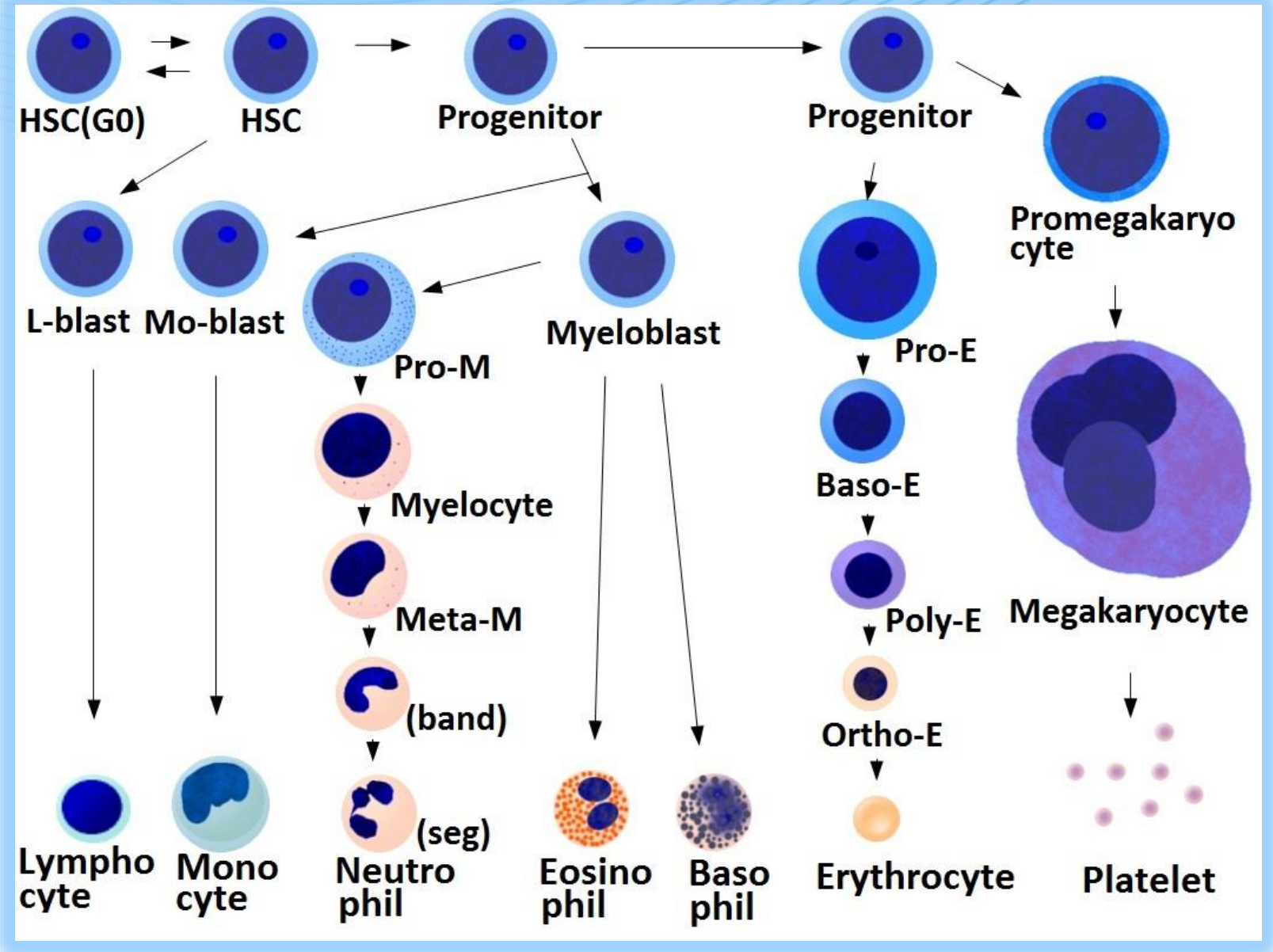
Трофические свойства

Иммуносупрессия

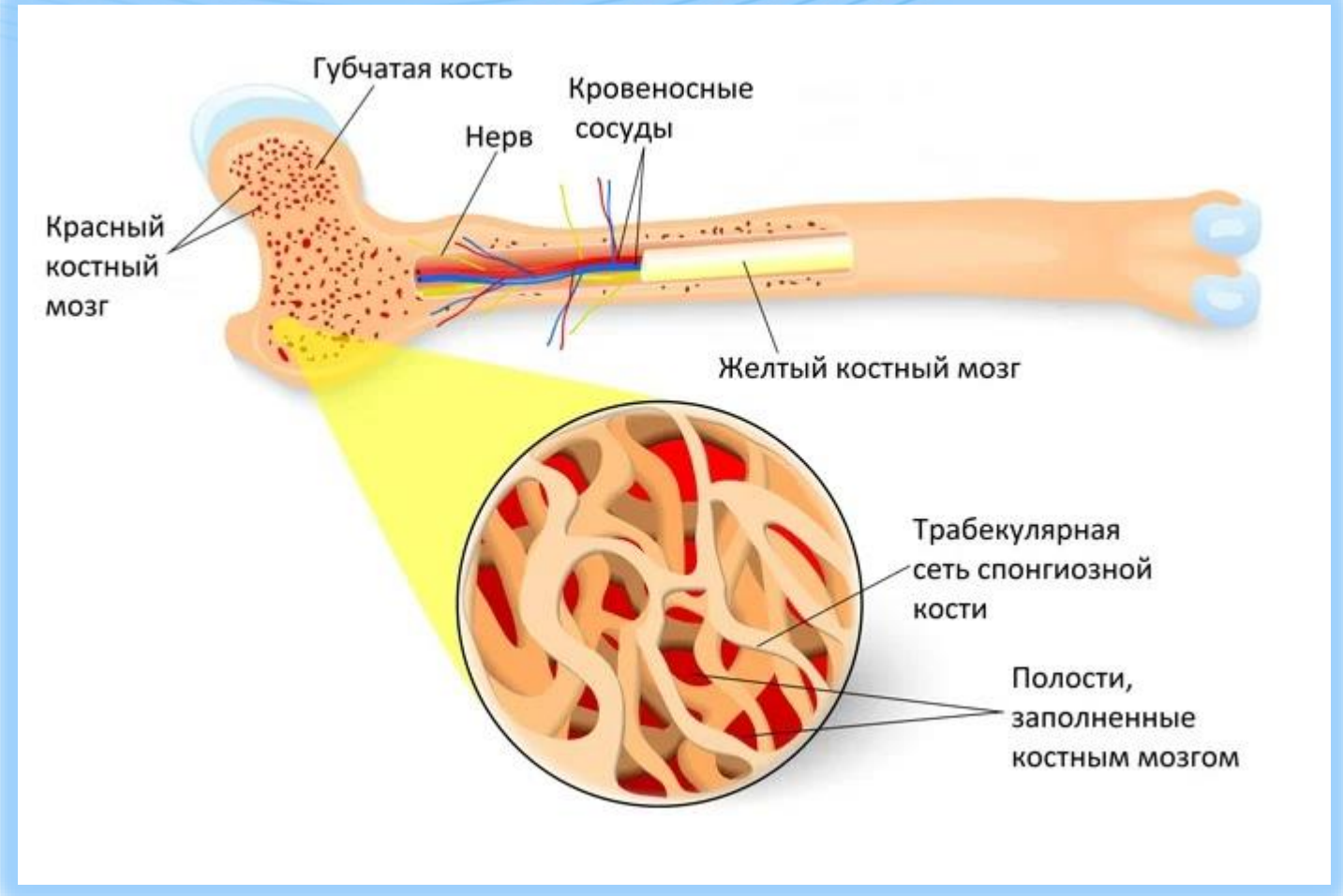


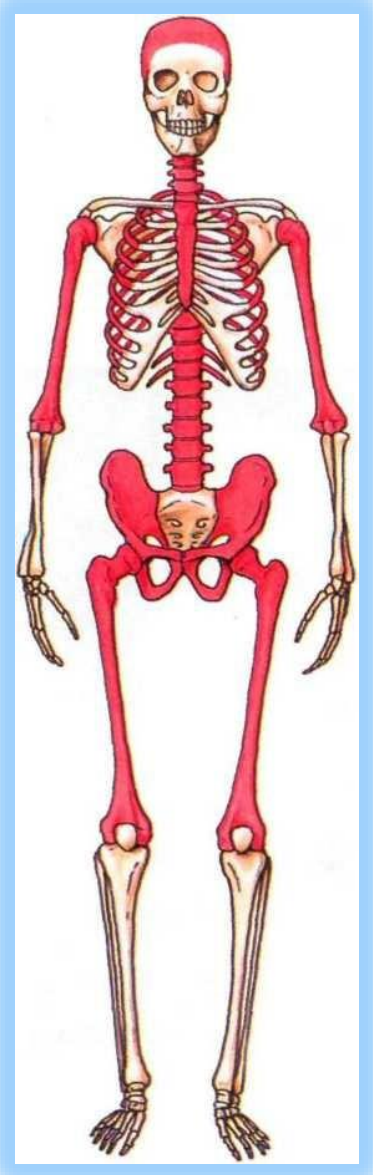
Дифференцировка: адипогенные, остеогенные и хондрогенные клетки, ЭК, гладкие мышцы сосудов и миоциты

Гематопоэтические стволовые клетки (HSC)

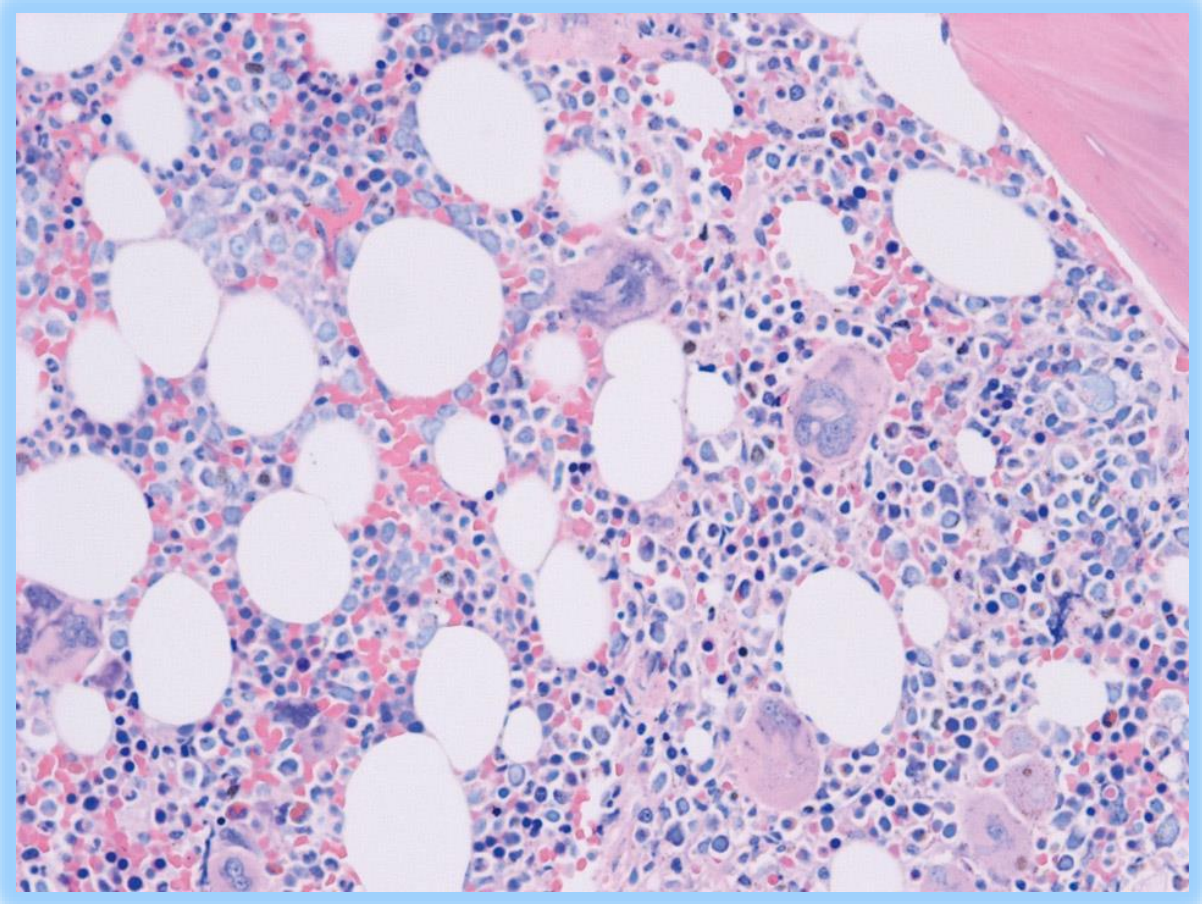


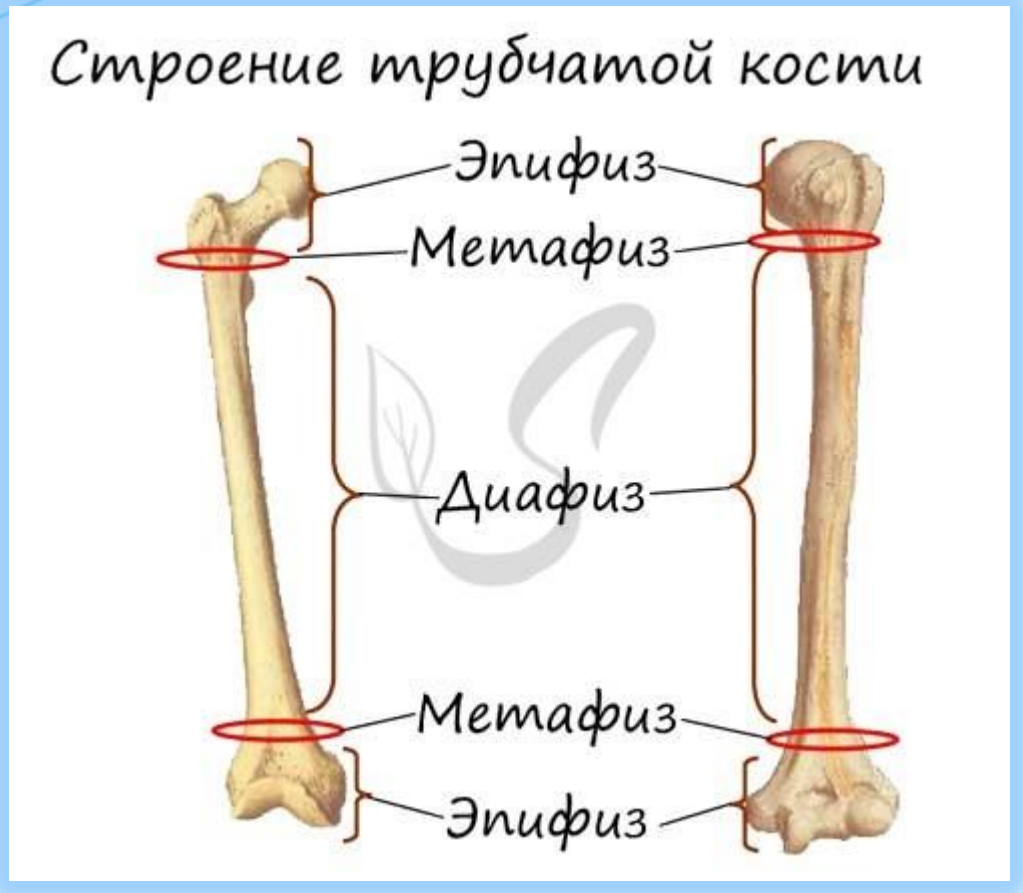
Гематопоэтические стволовые клетки (HSC)





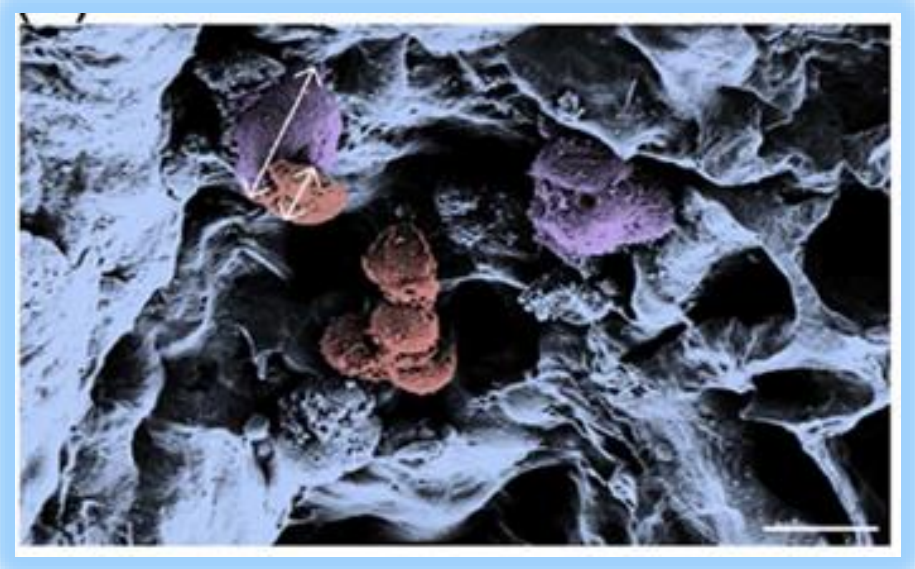
Гематопоэтические стволовые клетки (HSC)

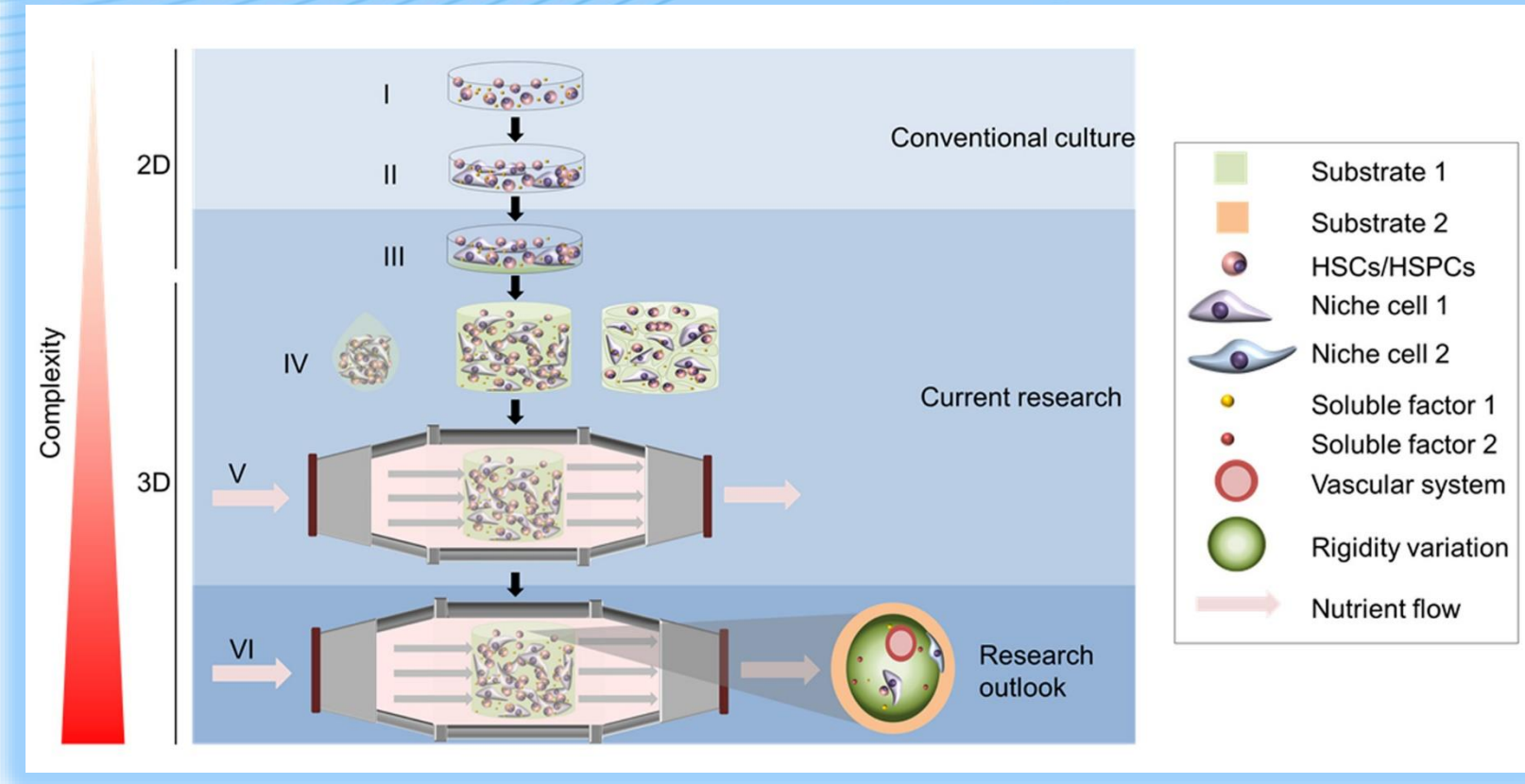




Гематопоэтические стволовые клетки (HSC)

bone marrow (BM)-on-a-chip





Raic A, Naolou T, Mohra A, Chatterjee C, Lee-Thedieck C. 3D models of the bone marrow in health and disease: yesterday, today, and tomorrow

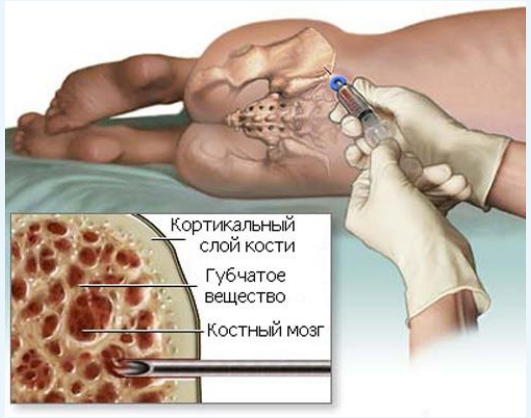
Получение первичной клеточной культуры

Жировая ткань (AT)

Ферментативное расщепление

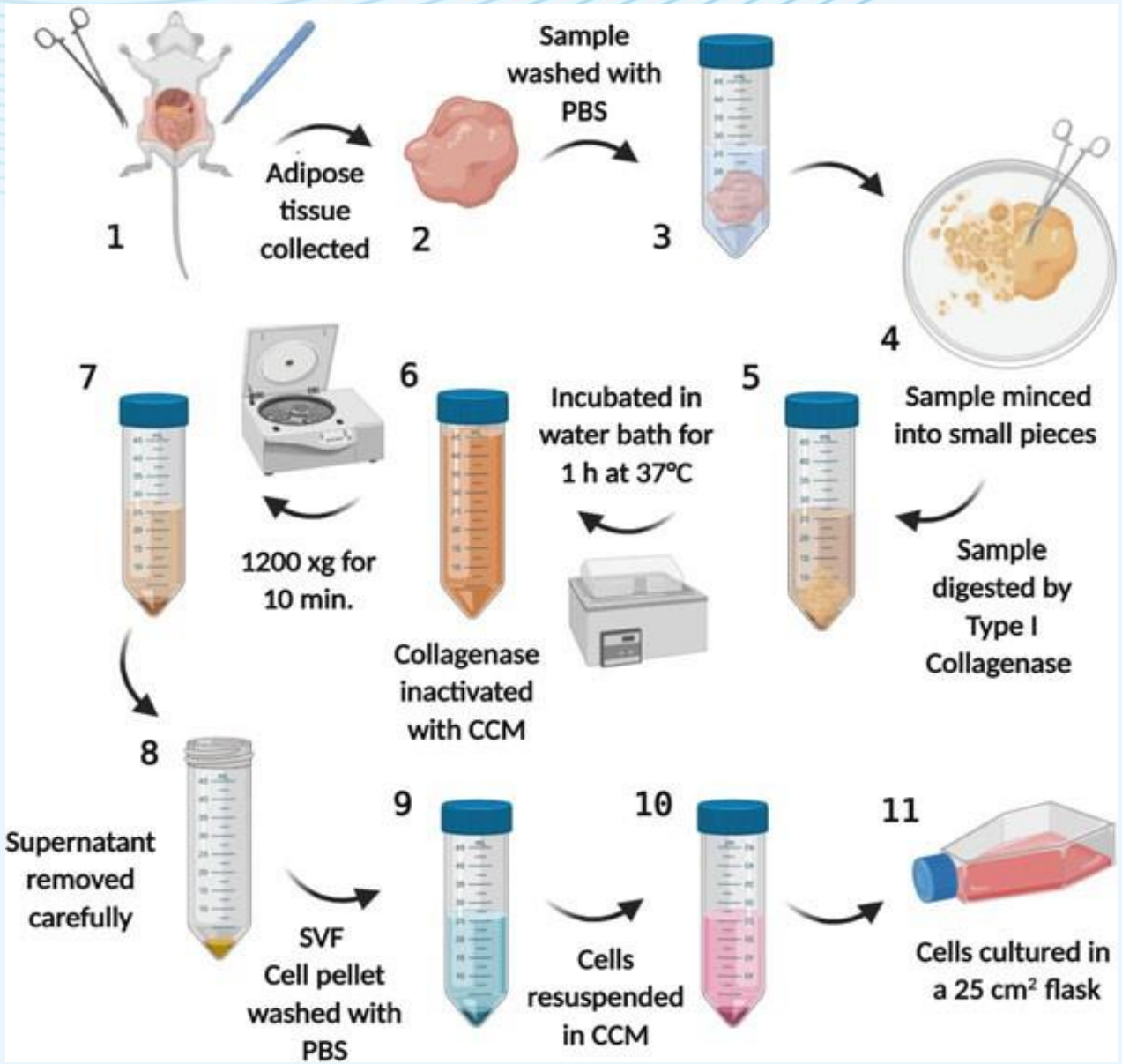
антитела

Костный мозг (BM)

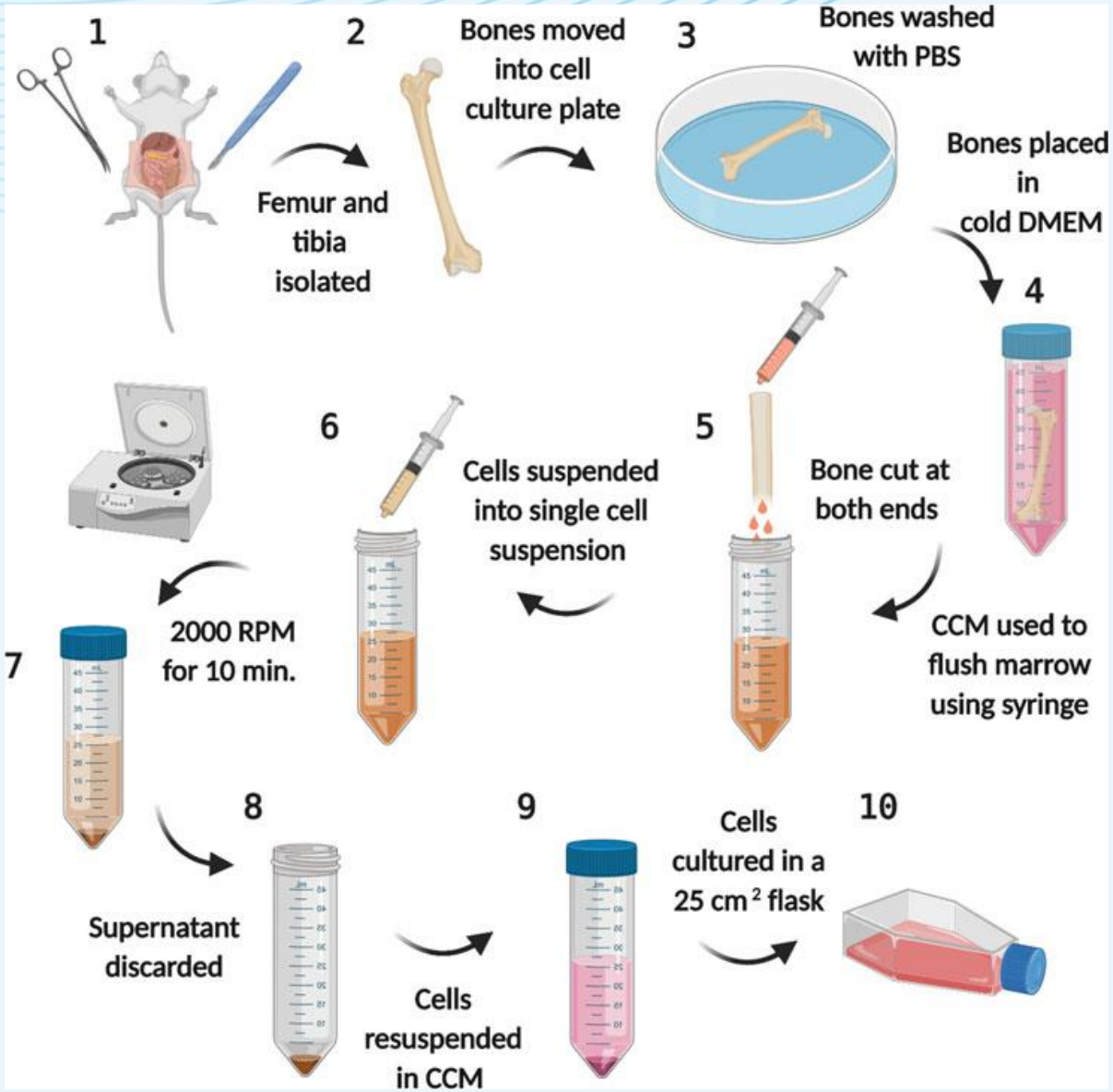


Культивирование эксплантатов

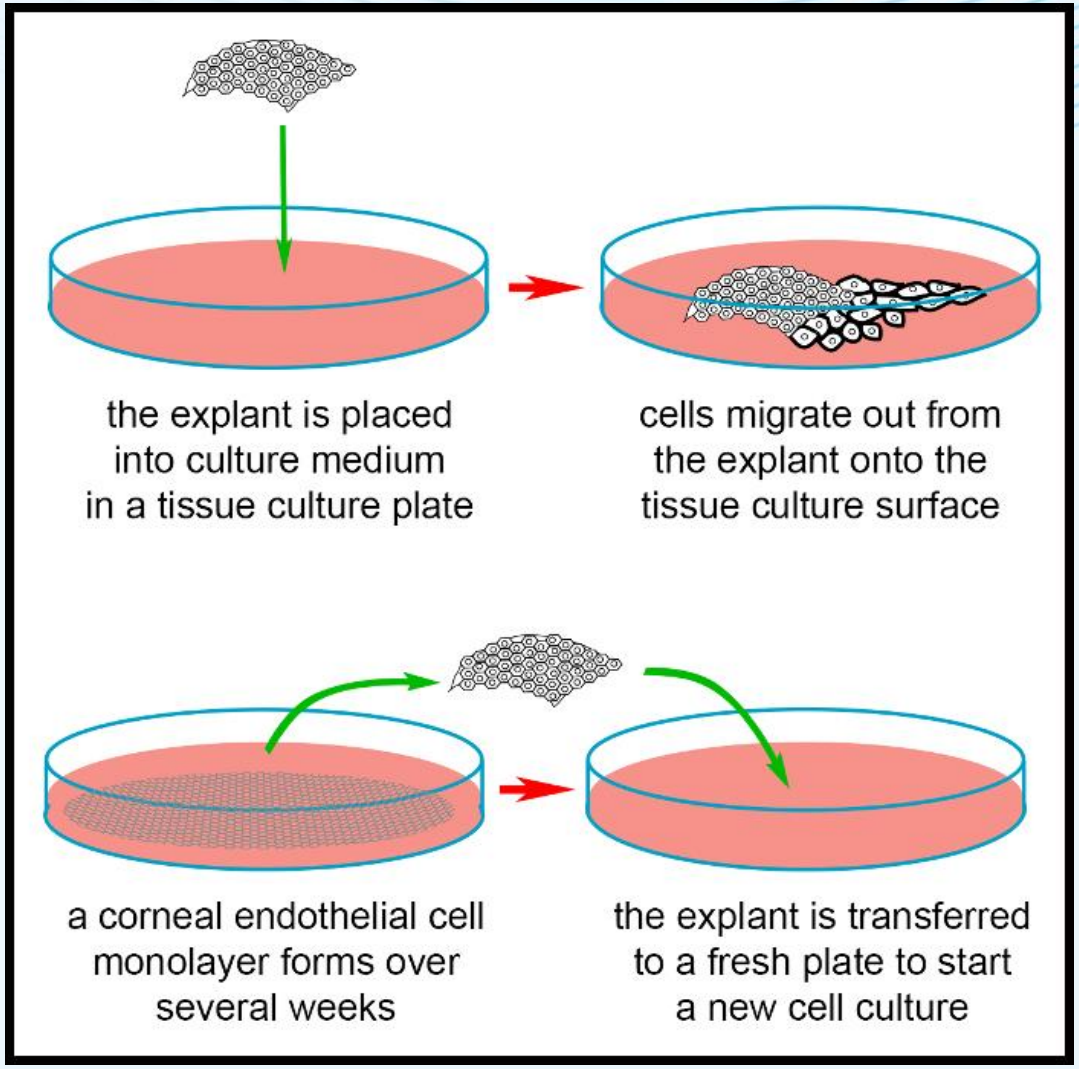
Ферментация жировой ткани

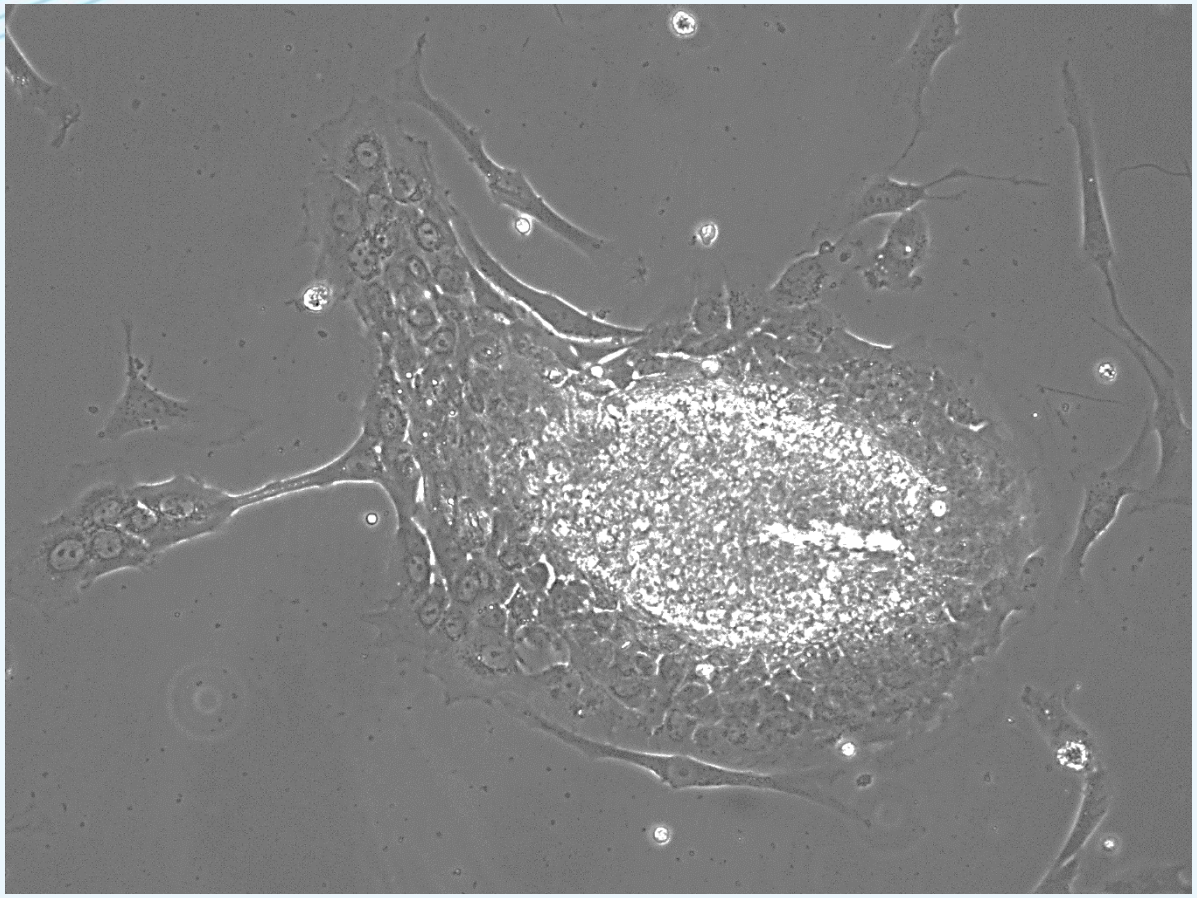


Выделение клеток костного мозга

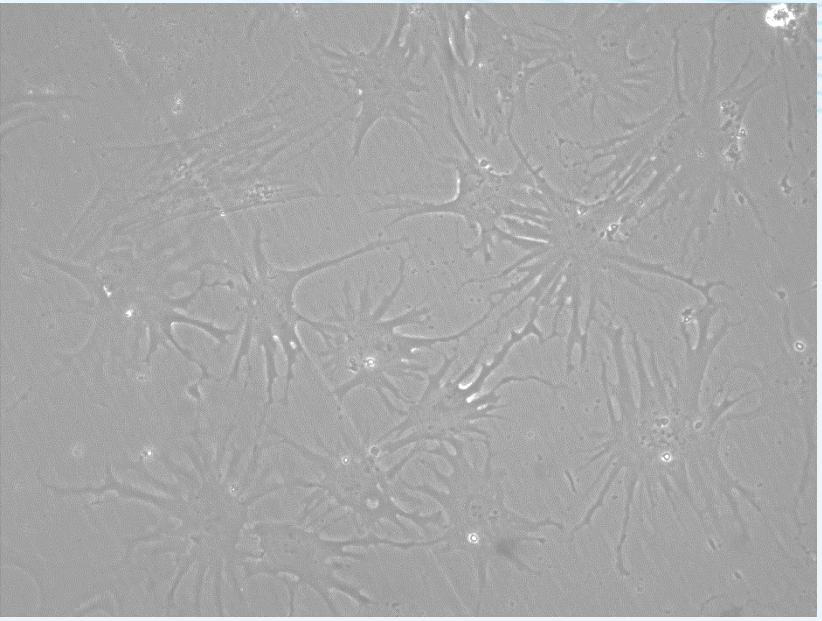


Эксплант

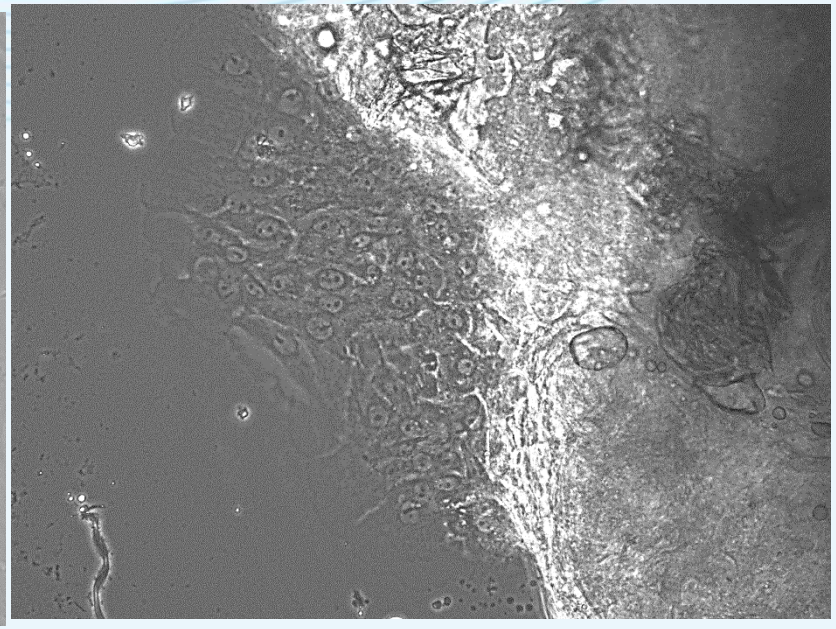

the explant is placed into culture medium in a tissue culture plate
cells migrate out from the explant onto the tissue culture surface
a corneal endothelial cell monolayer forms over several weeks
the explant is transferred to a fresh plate to start a new cell culture



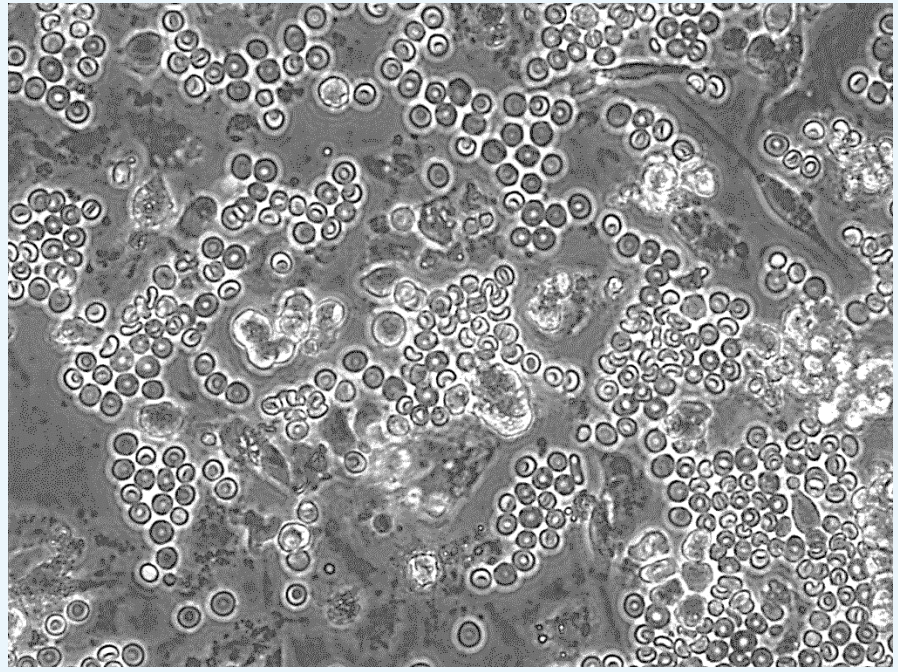
Первичная культура клеток



Клетки выделенные из сердца мыши



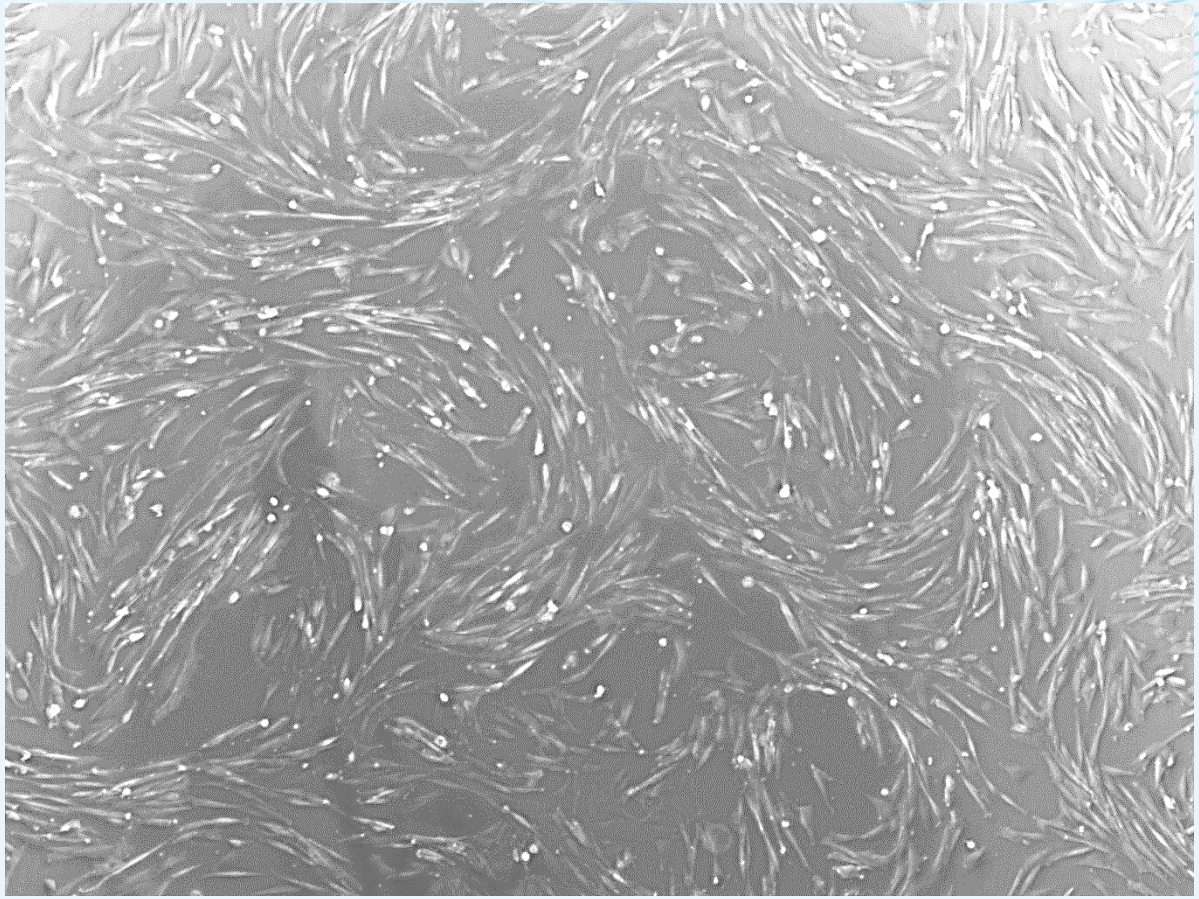
Дермальный эксплант



Гетерогенная культура костного мозга

Культура клеток

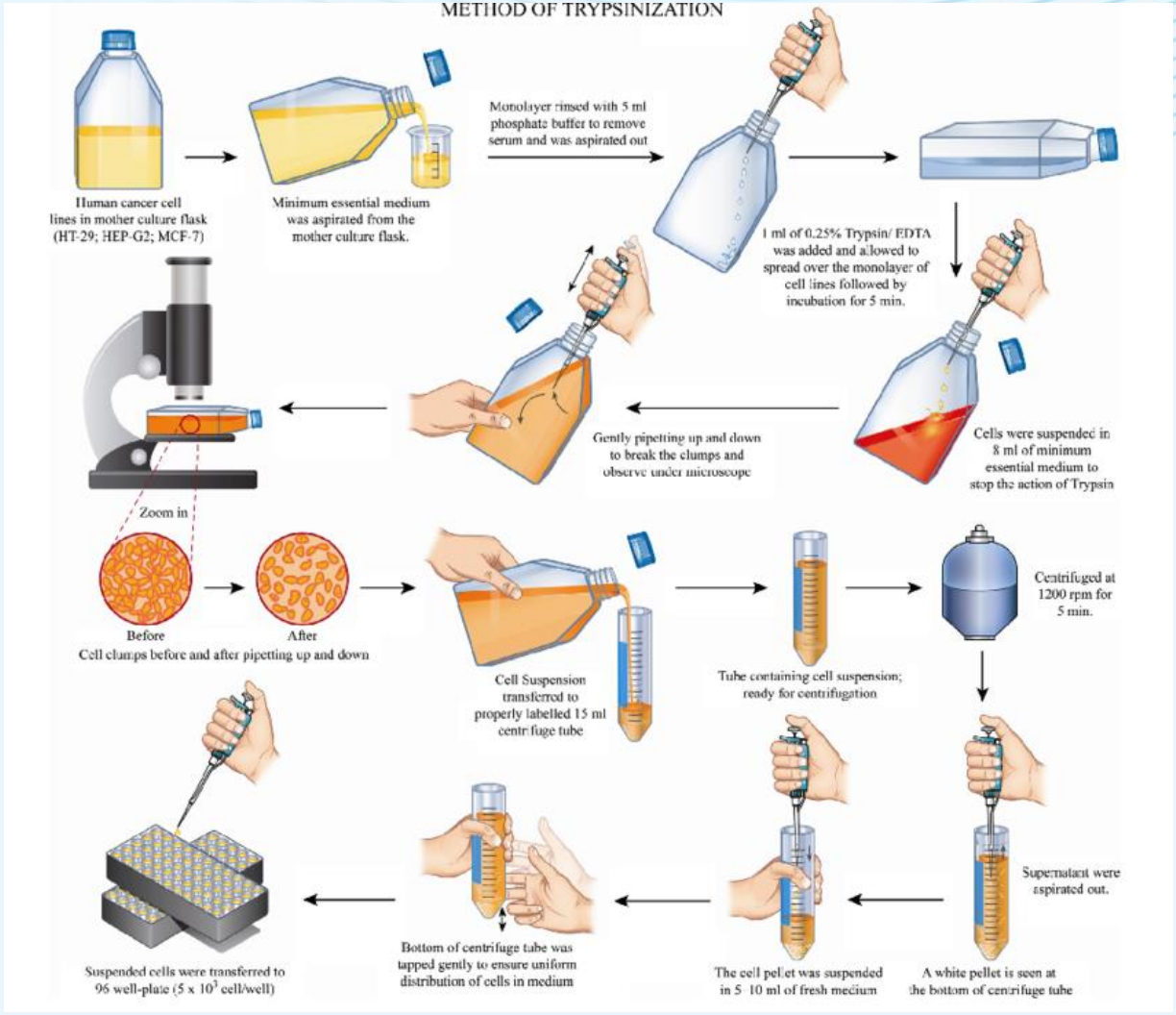
БФУ им. И. Канта

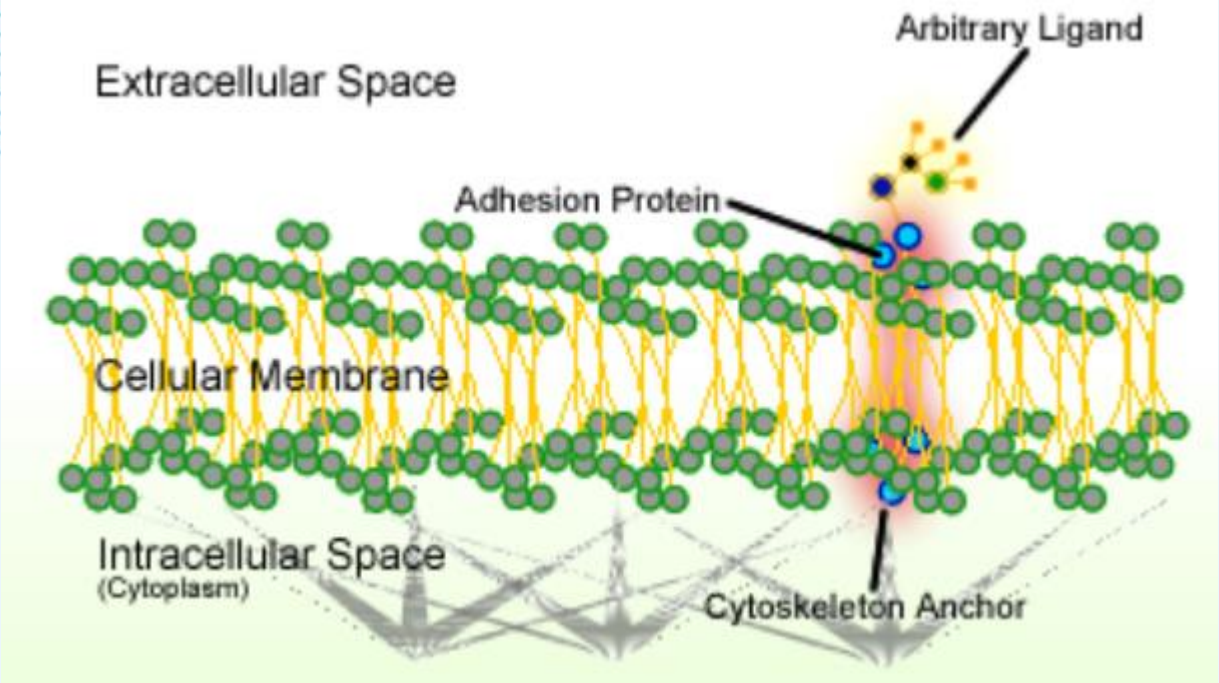


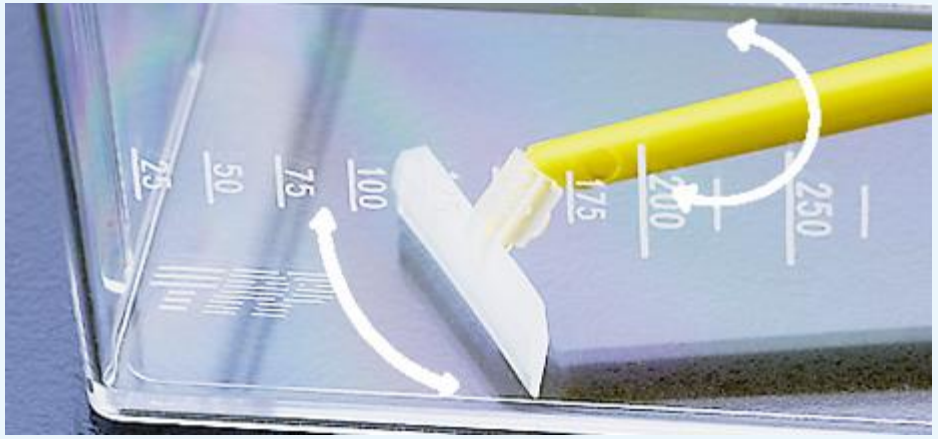
монослой клеток

Условия культивирования

Клеточная адгезия

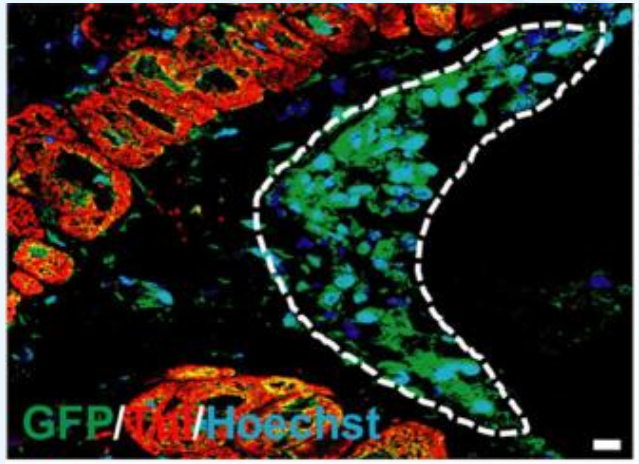






МСК при повреждении миокарда

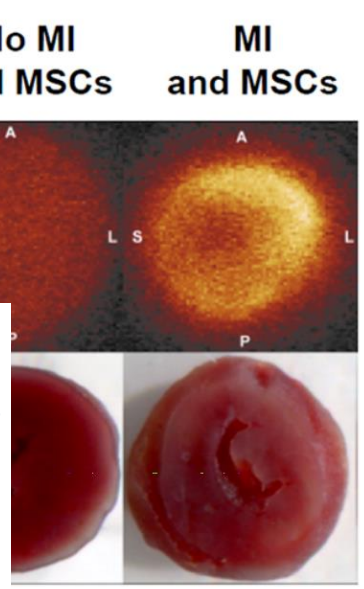
БФУ им. И. Канта



Культивирование клеток в условиях гипоксии повышает эффективность трансплантации МСК

Intravenously Delivered Mesenchymal Stem Cells: Systemic Anti-Inflammatory Effects Improve Left Ventricular Dysfunction in Acute Myocardial Infarction and Ischemic Cardiomyopathy.

Luger D[1], Lipinski MJ[1], Westman PC[1], Glover DK[1], Dimastromatteo J[1], Frias JC[1], Albelda MT[1], Sikora S[1], Kharazi A[1], Vertelov G[1], Waksman R[1], Epstein SE[1]



Circ Res. 2016 Mar 18; 118(6): 970–983.
Published online 2016 Mar 17. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307516
PMCID: PMC4894788
PMID: 26838793

A Large-Scale Investigation of Hypoxia-Preconditioned Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Myocardial Repair in Nonhuman Primates

Paracrine Activity Without Remuscularization

Xinyang Hu,* Yinchuan Xu,* Zhiwei Zhong, Yan Wu, Jing Zhao, Yingchao Wang, Haifeng Cheng, Min
Fengjiang Zhang, Qi Chen, Jianzhong Sun, Qian Li, Jing Jin, Qingju Li, Lihong Chen, Chen Wang, H
Youqi Fan, Qian Yang, Lei Yu, Rongrong Wu, Jie Liang, Jinyun Zhu, Ya Wang, Yiping Jin, Yifan Lin, F
Liangliang Jia, Wei Zhu, Jinghai Chen, Hong Yu, Jianyi Zhang,✉ and Jian'an Wang✉

J Am Coll Cardiol. Author manuscript; available in PMC 2013 Feb 25.
Published in final edited form as:
J Am Coll Cardiol. 2009 Dec 8; 54(24): 2277–2286.
doi: 10.1016/j.jacc.2009.06.055
PMCID: PMC3580848
NIHMSID: NIHMS168198
PMID: 19958962

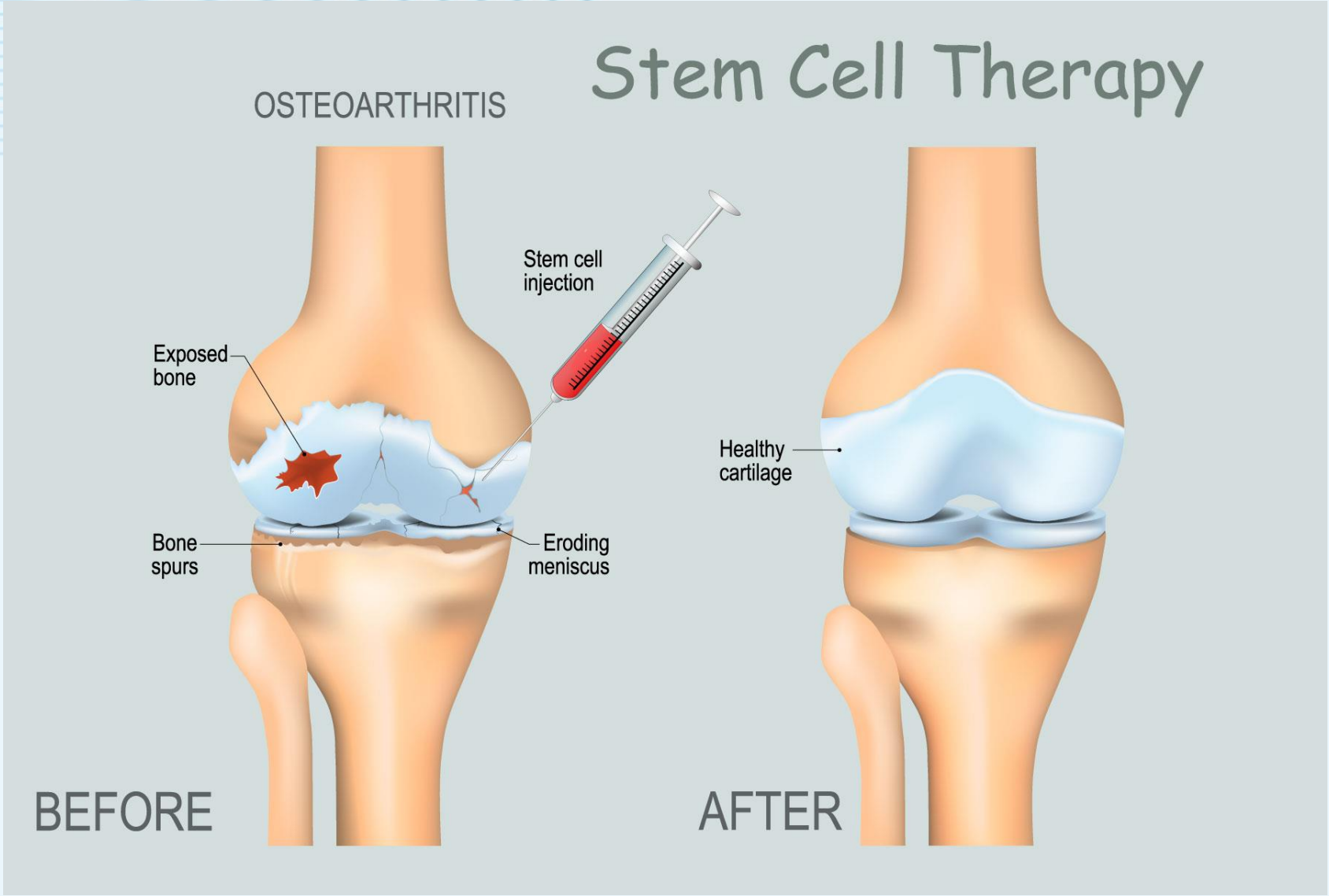
A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Escalation Study of Intravenous Adult Human Mesenchymal Stem Cells (Prochymal) After Acute Myocardial Infarction

Joshua M. Hare, MD,* Jay H. Traverse, MD,† Timothy D. Henry, MD,† Nabil Dib, MD,‡ Robert K. Strumpf, MD,‡ Steven P. Schulman, MD,§ Gary Gerstenblith, MD,§ Anthony N. DeMaria, MD,‖ Ali E. Denktas, MD,¶ Roger S. Gammon, MD,# James B. Hermiller, Jr, MD,** Mark A. Reisman, MD,†† Gary L. Schaer, MD,‡‡ and Warren Sherman, MD§§

МСК, полученные из костного мозга, могут смягчить последствия инфаркта миокарда

МСК для регенерации хряща

- Запуск продукции коллагена типа II для усиления регенерации мениска
- Ускорение восстановления переломов
- Облегчение боли и значительное улучшение качества хрящевой ткани при остеоартрите



Clinical Trial > Transplantation. 2013 Jun 27;95(12):1535-41. doi: 10.1097/TP.0b013e318291a2da.

Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study

luis Orozco [1], Anna Munar, Robert Soler, Mercedes Alberca, Francesc Soler, Marina Huguet, oan Sentís, Ana Sánchez, Javier García-Sancho

ffiliations + expand

MID: 23680930 DOI: 10.1097/TP.0b013e318291a2da

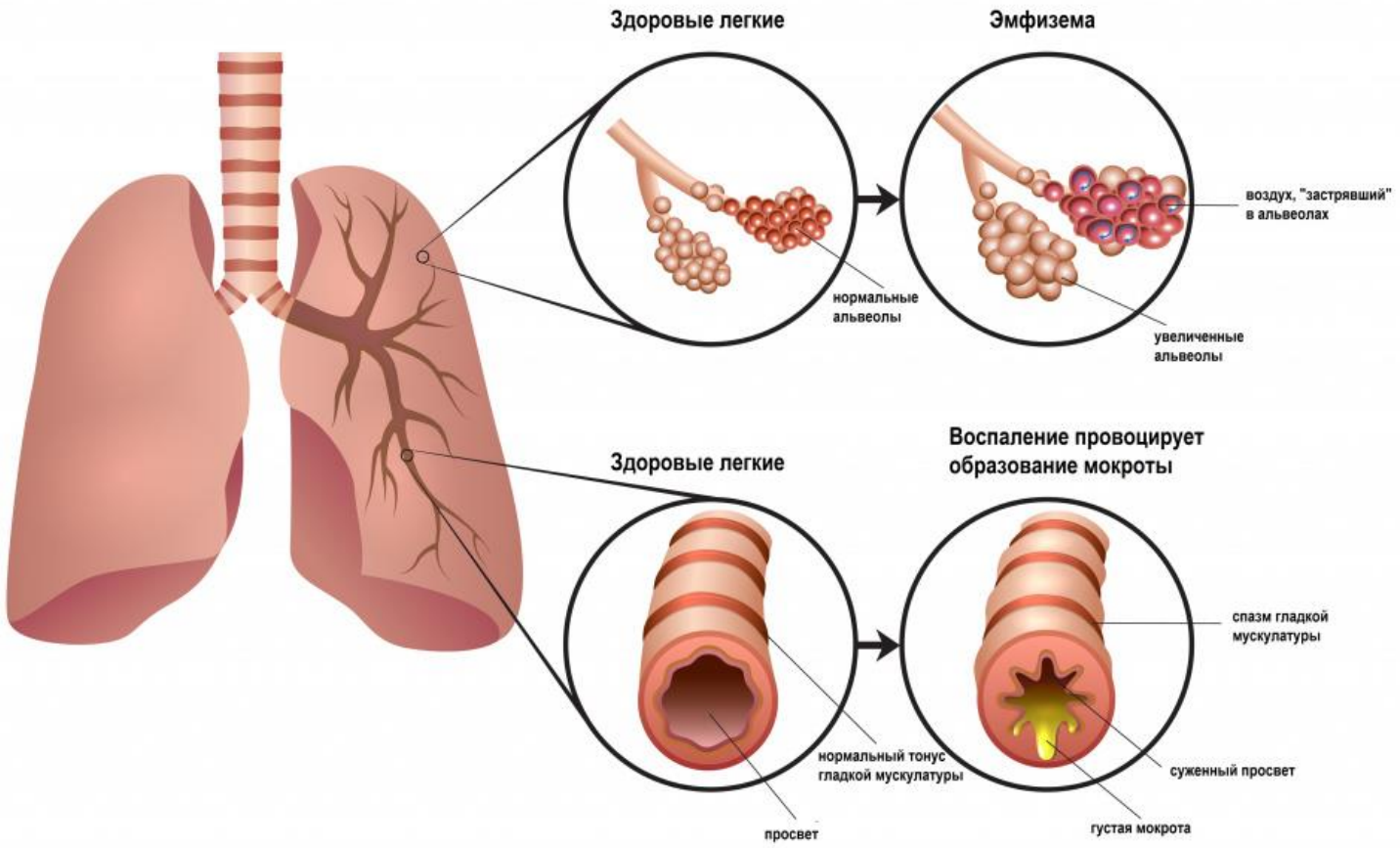
МСК при заболевании легких

- Комбинированное использование улучшает показатели качества жизни
- Снижение степени тяжести бронхолегочной дисплазии

Clinical Trial > Stem Cells Transl Med. 2017 Mar;6(3):962-969. doi: 10.1002/sctm.16-0315. Epub 2016 Dec 9.

Combined Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cell Therapy and One-Way Endobronchial Valve Placement in Patients with Pulmonary Emphysema: A Phase I Clinical Trial

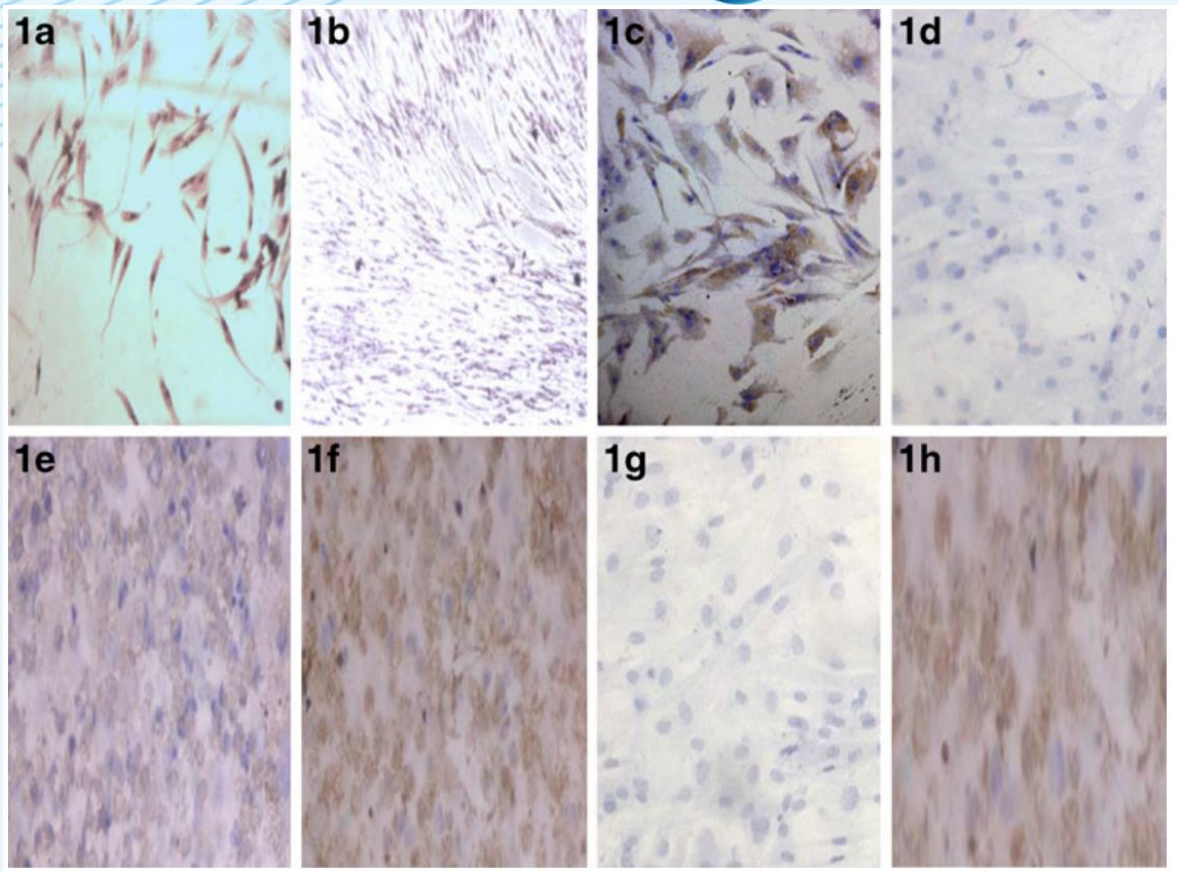
Hugo Goulart de Oliveira [1 2], Fernanda Ferreira Cruz [3], Mariana Alves Antunes [3], Amarilio Vieira de Macedo Neto [1 2], Guilherme Augusto Oliveira [2], Fabio Munhoz Svartman [1 2], Tamara Borgonovo [4], Carmen Lucia Kuniyoshi Rebelatto [4], Daniel J Weiss [5], Paulo Roberto Slud Brofman [4], Marcelo Marcos Morales [3], José Roberto Lapa E Silva [6], Patricia Rieken Macedo Rocco [3]



МСК при заболеваниях печени

- После трансплантации МСК наблюдались неоваскуляризация, структура, подобная желчным канальцам, и некоторые гепатоцитоподобные клетки

- Улучшение функции печени



Clinical Trial > Stem Cell Rev Rep. 2012 Sep;8(3):972-81. doi: 10.1007/s12015-011-9322-y.

Phase II trial: undifferentiated versus differentiated autologous mesenchymal stem cells transplantation in Egyptian patients with HCV induced liver cirrhosis

Mervat El-Ansary [1], Iman Abdel-Aziz, Sherif Mogawer, Samah Abdel-Hamid, Olfat Hammam, Salwa Teaema, Marwa Wahdan

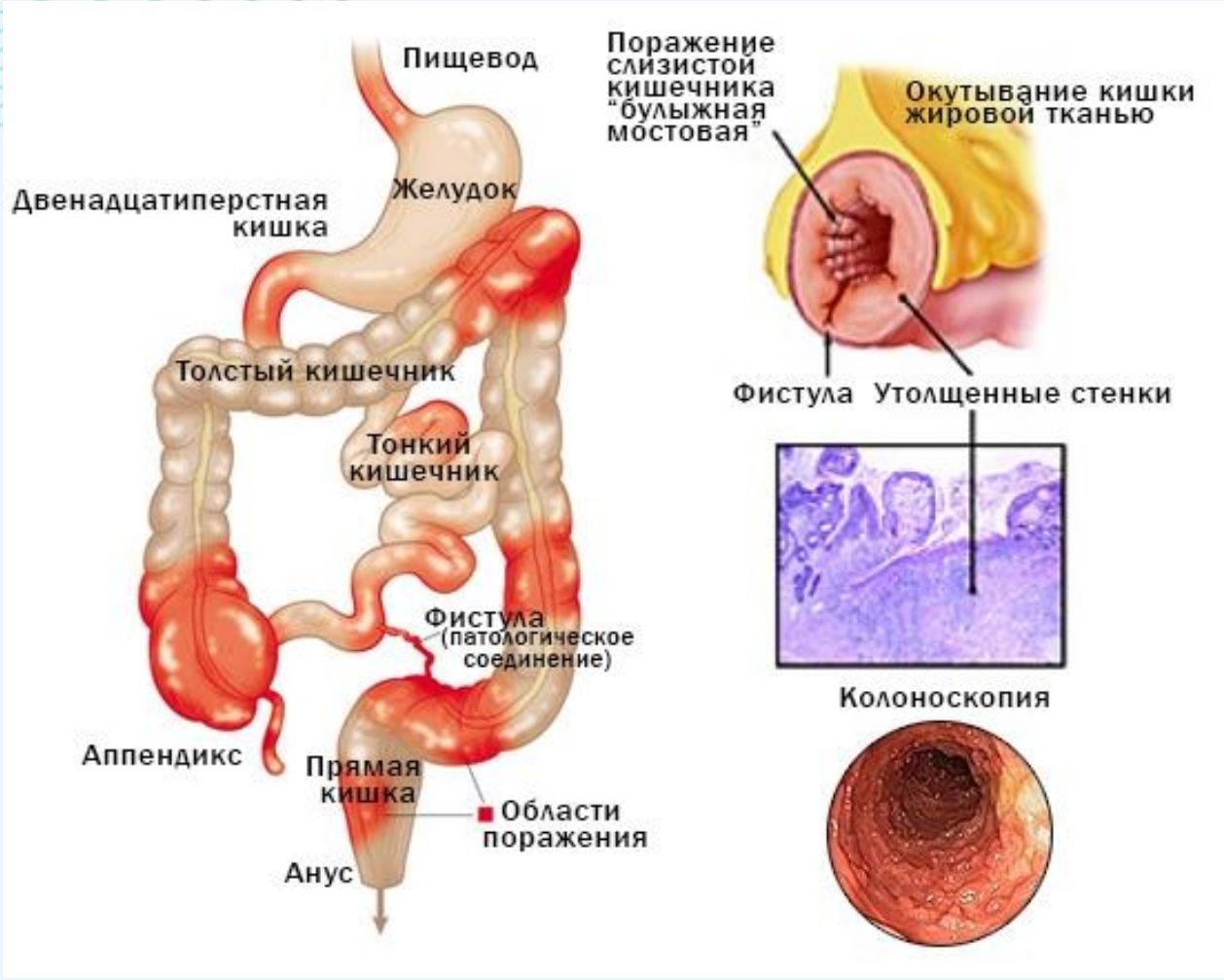
Affiliations + expand

PMID: 21989829 DOI: 10.1007/s12015-011-9322-y

Фотография недифференцированной и дифференцированной культуры МСК;
a,b,c,d Недифференцированные мезенхимальные клетки,
e,f ,g,h Новообразованные гепатоциты

МСК при желудочно-кишечных заболеваниях

- Улучшают структуру эпителия толстой кишки
- Повышают проницаемость
- Ремиссия



Clinical Trial > Clin Gastroenterol Hepatol. 2014 Jan;12(1):64-71. doi: 10.1016/j.cgh.2013.06.021. Epub 2013 Jul 19.

A phase 2 study of allogeneic mesenchymal stromal cells for luminal Crohn's disease refractory to biologic therapy

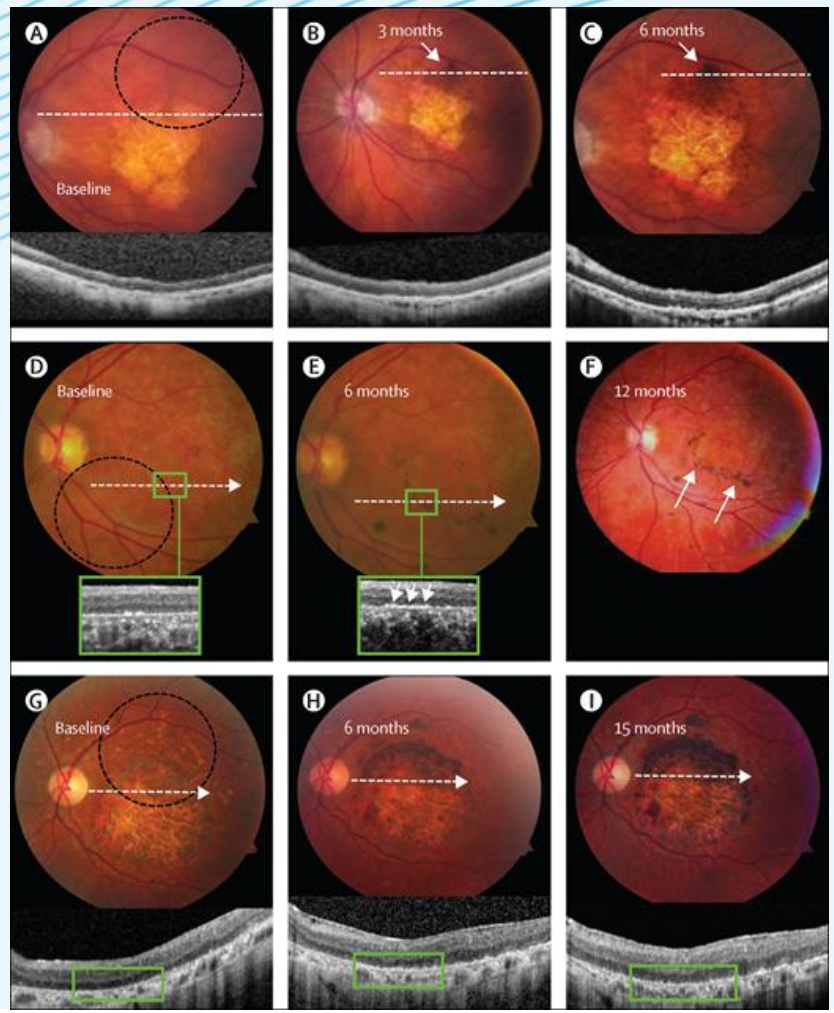
Geoffrey M Forbes [1], Marian J Sturm [2], Rupert W Leong [3], Miles P Sparrow [4], Dev Segarajasingam [5], Adrian G Cummins [6], Michael Phillips [7], Richard P Herrmann [2]

Affiliations + expand

PMID: 23872668 DOI: 10.1016/j.cgh.2013.06.021

Терапия стволовыми клетками при заболеваниях сетчатки

- ИПСК человека, успешно восстанавливают функцию сетчатки
- ЭСК скорректировали остроту зрения и повысили показатели качества жизни при дегенерации желтого пятна
- Образование новых межклеточных связей, регенерация клеток и прогрессирование различных зрительных функций



Cells. 2017 Mar; 6(1): 4.
Published online 2017 Feb 2. doi: 10.3390/cells6010004
PMCID: PMC5371869
PMID: 28157165

Stem Cell Therapies in Retinal Disorders

Aakriti Garg,[1] Jin Yang,[1,2] Winston Lee,[1,2] and Stephen H. Tsang[1,2,*]

Ilyas Singeç, Academic Editor

▸ Author information ▸ Article notes ▸ Copyright and License information Disclaimer

Review › Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016 Apr 1;57(5):ORSFc1-9. doi: 10.1167/iovs.15-18681.

Subretinal Transplantation of Embryonic Stem Cell–Derived Retinal Pigment Epithelium for the Treatment of Macular Degeneration: An Assessment at 4 Years

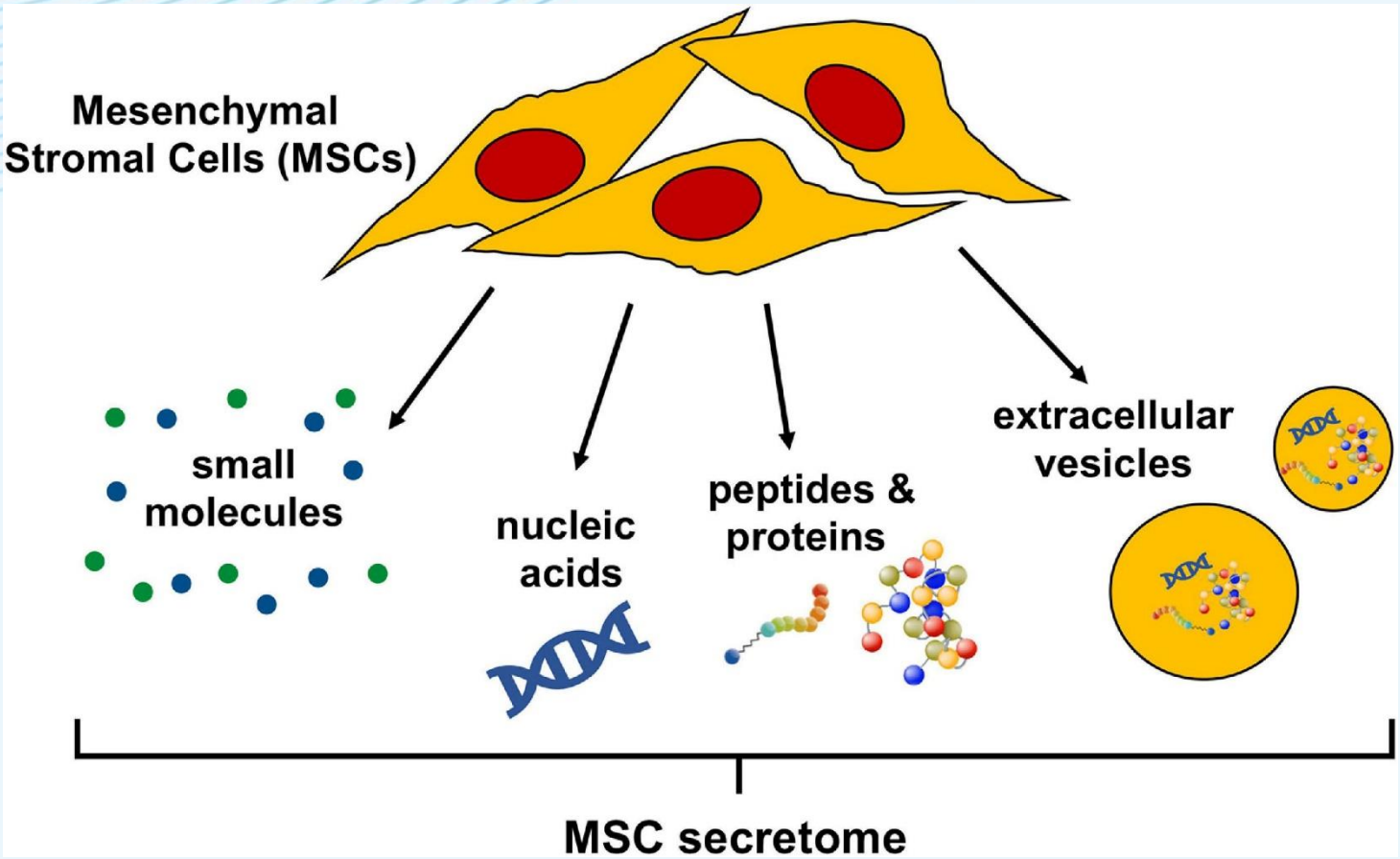
Steven D Schwartz [1], Gavin Tan [2], Hamid Hosseini [1], Aaron Nagiel [1]

Affiliations + expand

PMID: 27116660 DOI: 10.1167/iovs.15-18681

Секретом стволовых клеток в регенеративной медицине

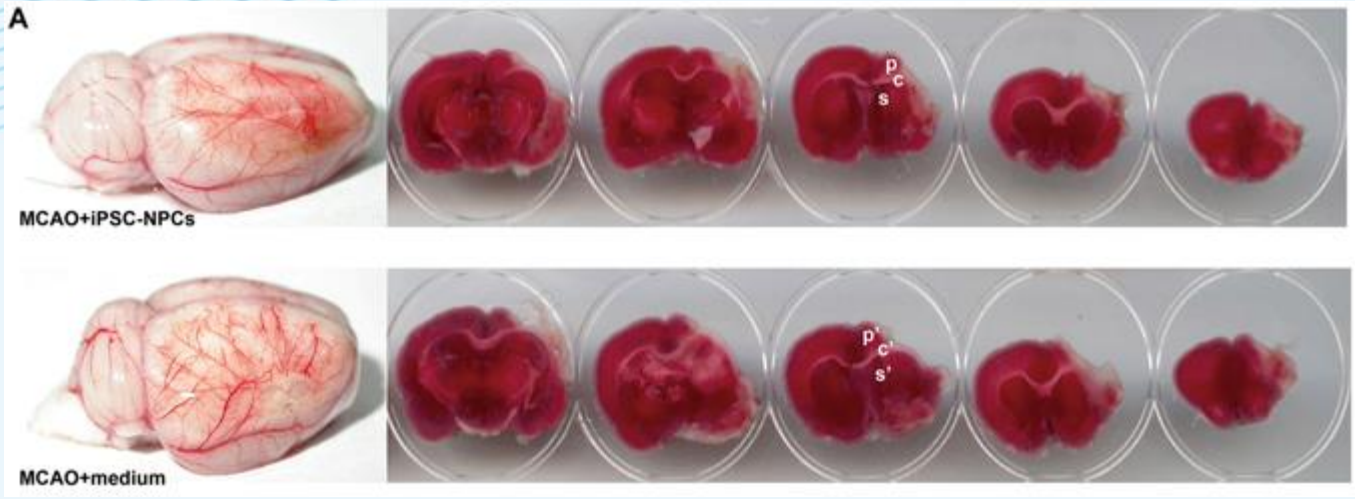
- растворимые белки
  - цитокины,
  - хемокины
  - факторы роста
- липиды
- внеклеточные везикулы (EV)



Клеточная терапия неврологических заболеваний

БФУ им. И. Канта

- Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки-предшественники нейральных клеток способствуют функциональному восстановлению после **инсульта**
- МСК способствуют внутренним защитным и репаративным механизмам после **травмы головного мозга**
- Нервные клетки-предшественники и МСК оказывают терапевтическое действие на **болезнь Паркинсона**
- Секретом способствует восстановлению опорно-двигательного аппарата при **травмах спинного мозга**



Sci Rep. 2017; 7: 1943. PMCID: PMC5434043
Published online 2017 May 16. doi: 10.1038/s41598-017-02137-w PMID: 28512358

Delayed epidural transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived neural progenitors enhances functional recovery after stroke

I-Hui Lee,[1,2] Shiang-Suo Huang,[3,4] Ching-Yu Chuang,[5,6] Ko-Hsun Liao,[1] Li-Hsin Chang,[2] Chia-Chi Chuang,[1] Yu-Shih Su,[2] Hung-Jui Lin,[7] Jui-Yu Hsieh,[7] Shu-Han Su,[7] Oscar Kuang-Sheng Lee,[8,9,10] and Hung-Chih Kuo[5,6]

▸ Author information ▸ Article notes ▸ Copyright and License information Disclaimer

Спасибо за внимание!!!