

БИОЛОГИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

ОБЩИЕ ПОНЯТИЯ

КРИТЕРИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Lajtha (1979)

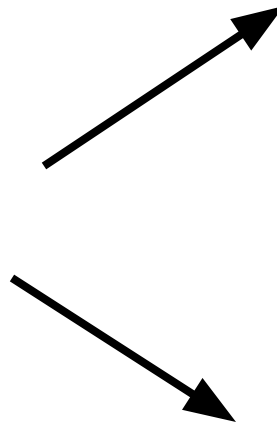
1. Стволовые клетки – самоподдерживающаяся клеточная субпопуляция
2. Стволовые клетки содержатся в тканях в состоянии пролиферативного покоя или крайне медленно циклируют
3. Содержание стволовых клеток в тканях крайне низкое в пределах 1-3%
4. Стволовые клетки активируются при повреждении
5. Стволовые клетки дают начало дифференцированным и СТВОЛОВЫМ КЛЕТКАМ

КРИТЕРИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

C. M. Verfillie (2004)

1. Стволовые клетки способны самообновляться, давая начало хотя-бы одной дочерней клетке с характеристиками стволовых.
2. Стволовые клетки способны проходить дифференцировку давая начало предшественникам, прогениторным и терминально дифференцированным клеткам.
3. Стволовые клетки репопулируют ткань *in vivo*, обеспечивая функциональное, структурное или морфологическое подобие.

**Стволовые
клетки**



эмбриональные

тканеспецифические
(фетальные и
постнатальные)

Классификация стволовых клеток:

Эмбриональные

Фетальные

Взрослые

По: M. Rao, 2004

Тотипотентные

Плюрипотентные

Мультипотентные

Унипотентные

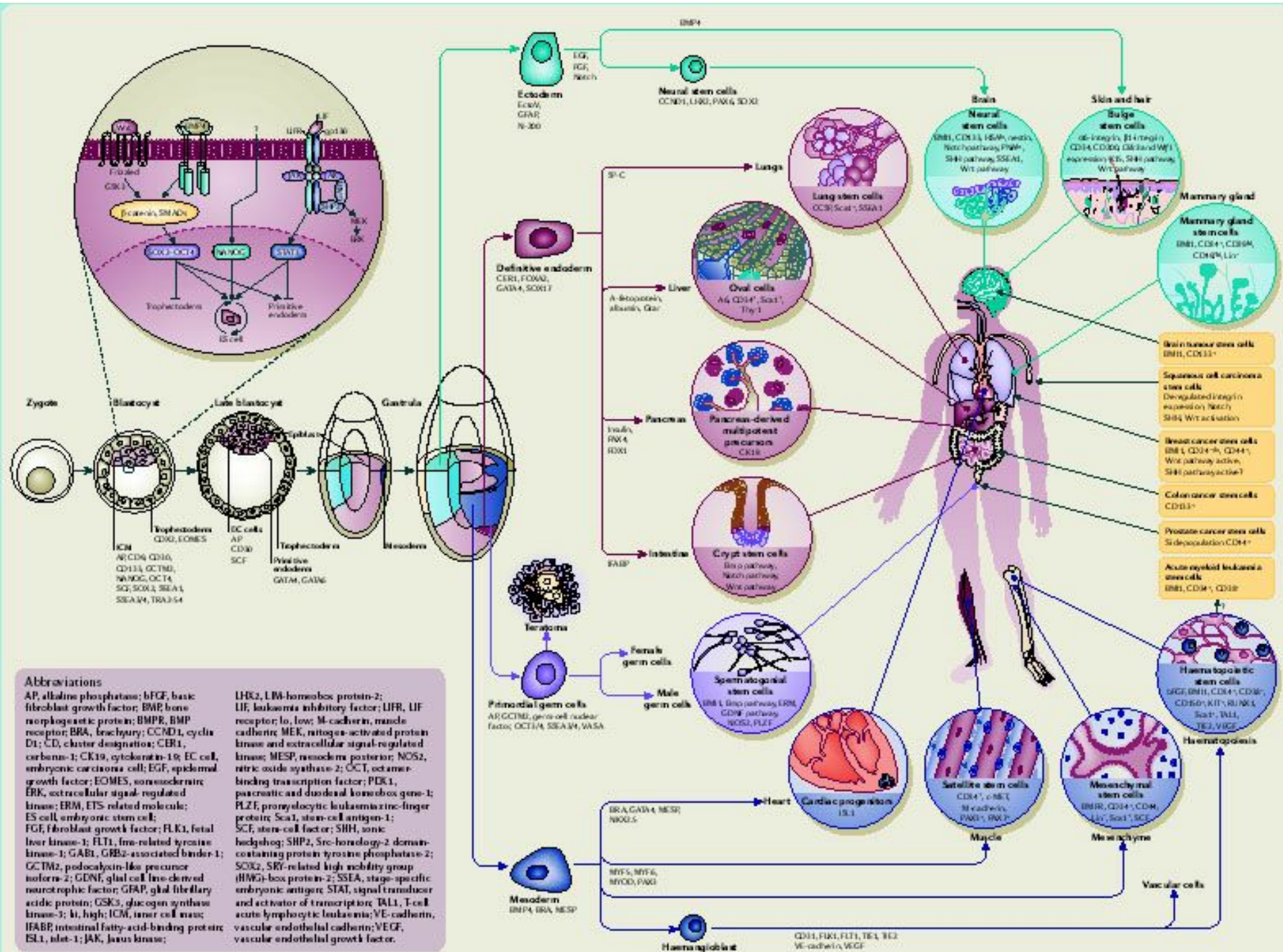
По: Wagers, Weissman, 2004

Зигота

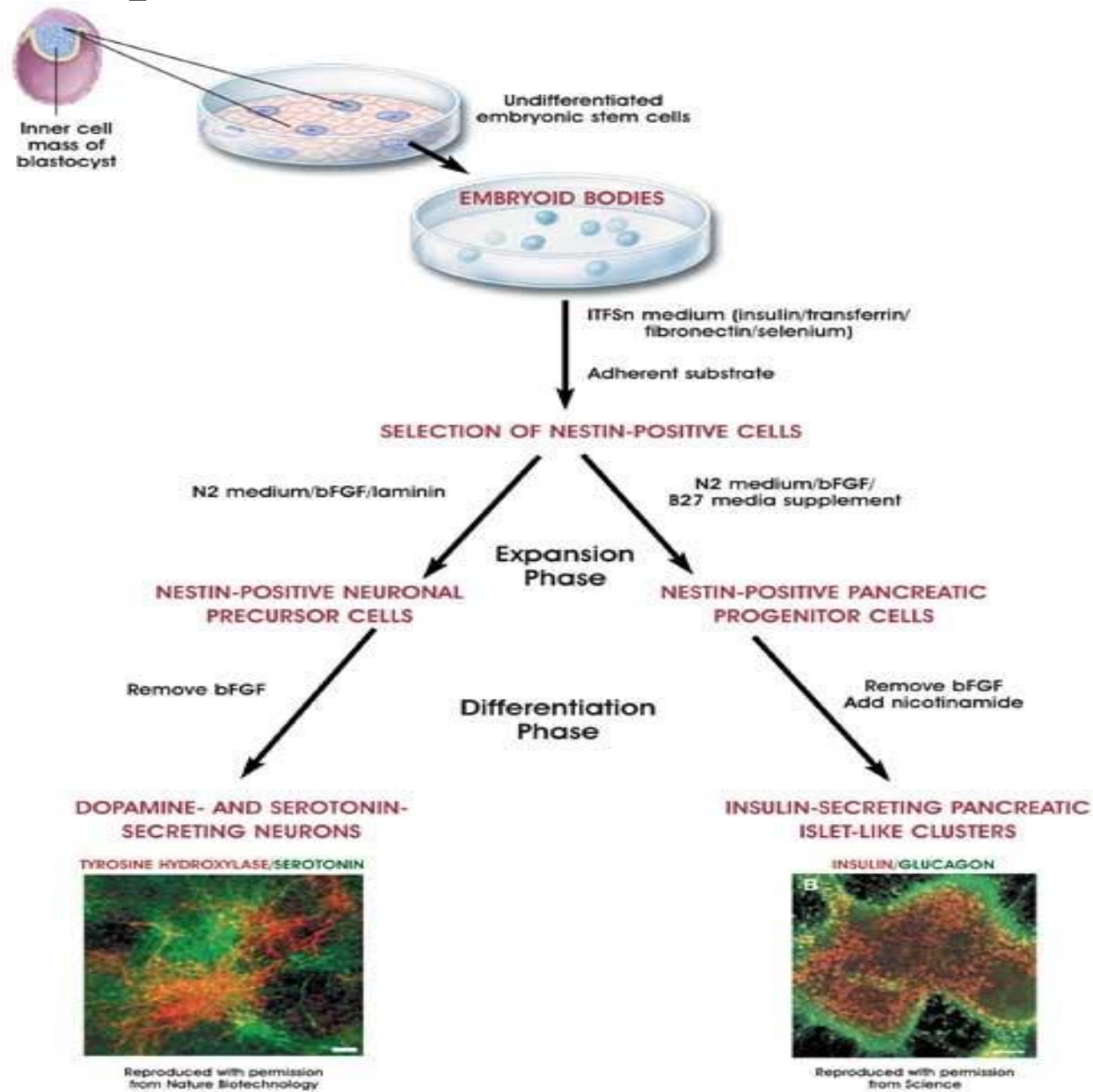
ЭСК

Мезенхимальная стволовая
клетка, Кроветворная стволовая
клетка, Эпидермальная
стволовая клетка

Сателлитная клетка мышц

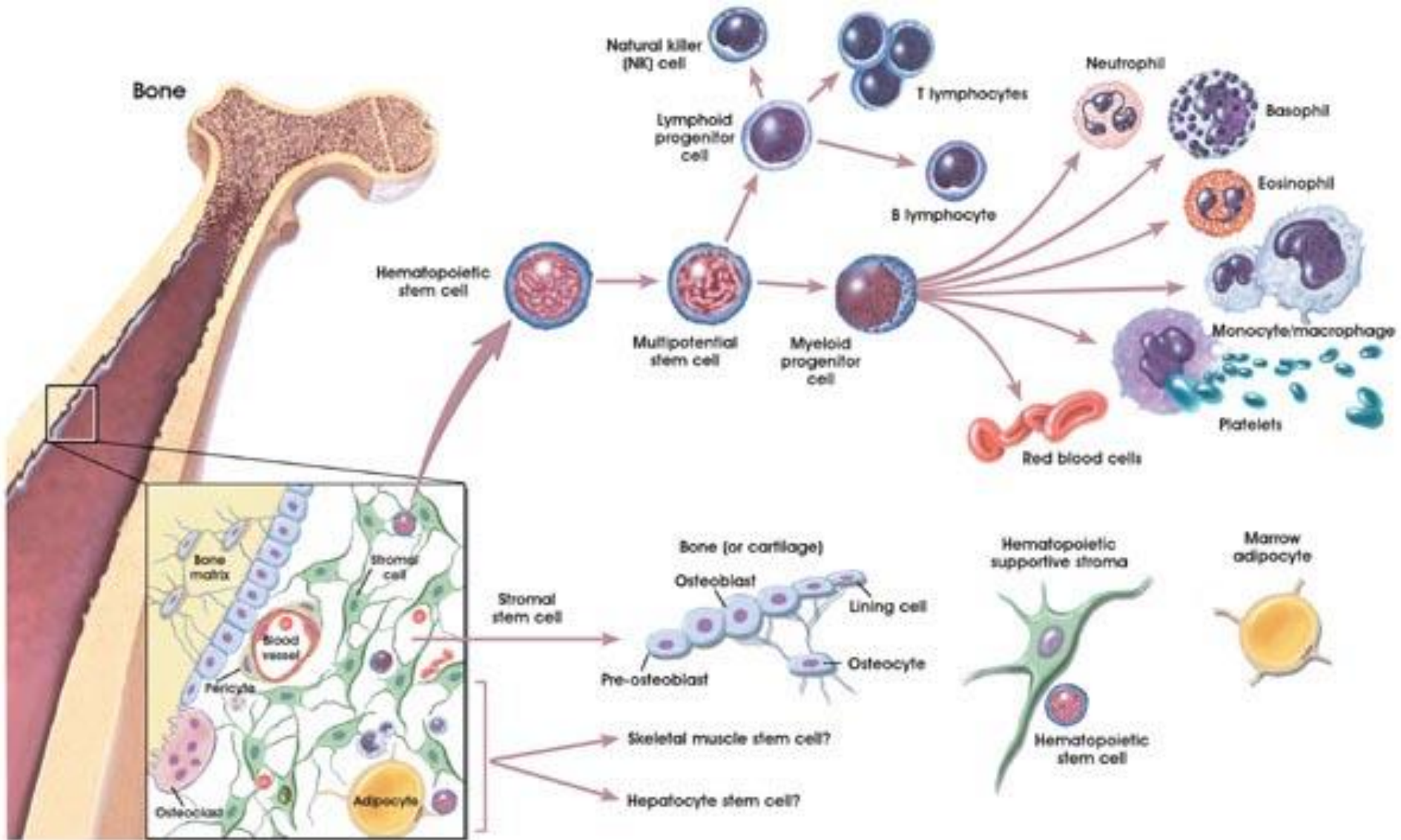


Эмбриональные стволовые клетки



Постнатальные стволовые клетки

Гемопоэтические стволовые клетки



МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

Максимов А.А. 1915

Фриденштейн А.Я. 1976, 1987

Каплан А. (Caplan A.) 1991

- Адгезивность к пластику в стандартных условиях *in vitro*;
- Способность к дифференцировке *in vitro* в остеобласты, хондробласты и адипоциты;
- Экспрессия специфических поверхностных маркеров.

«+»

«-»

CD105 (эндоглин,

CD45 – лейкоциты

рецептор к TGFβ)

CD34 – кроветворные и CD73 (экто-5'-

нуклеотидаза) эндотелиальные клетки

CD90 (Thy1 – семейство

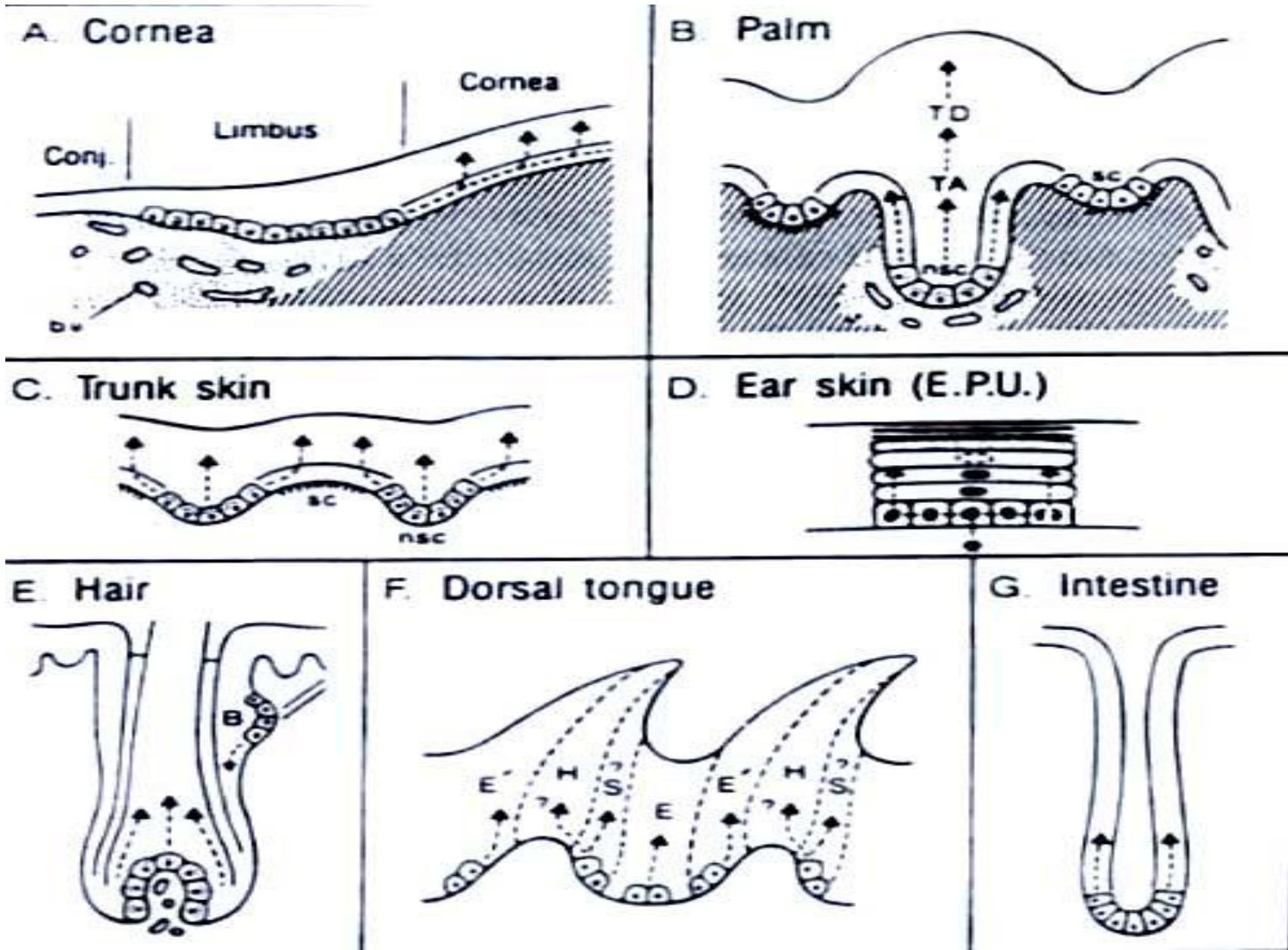
CD14 и CD11b – макрофаги

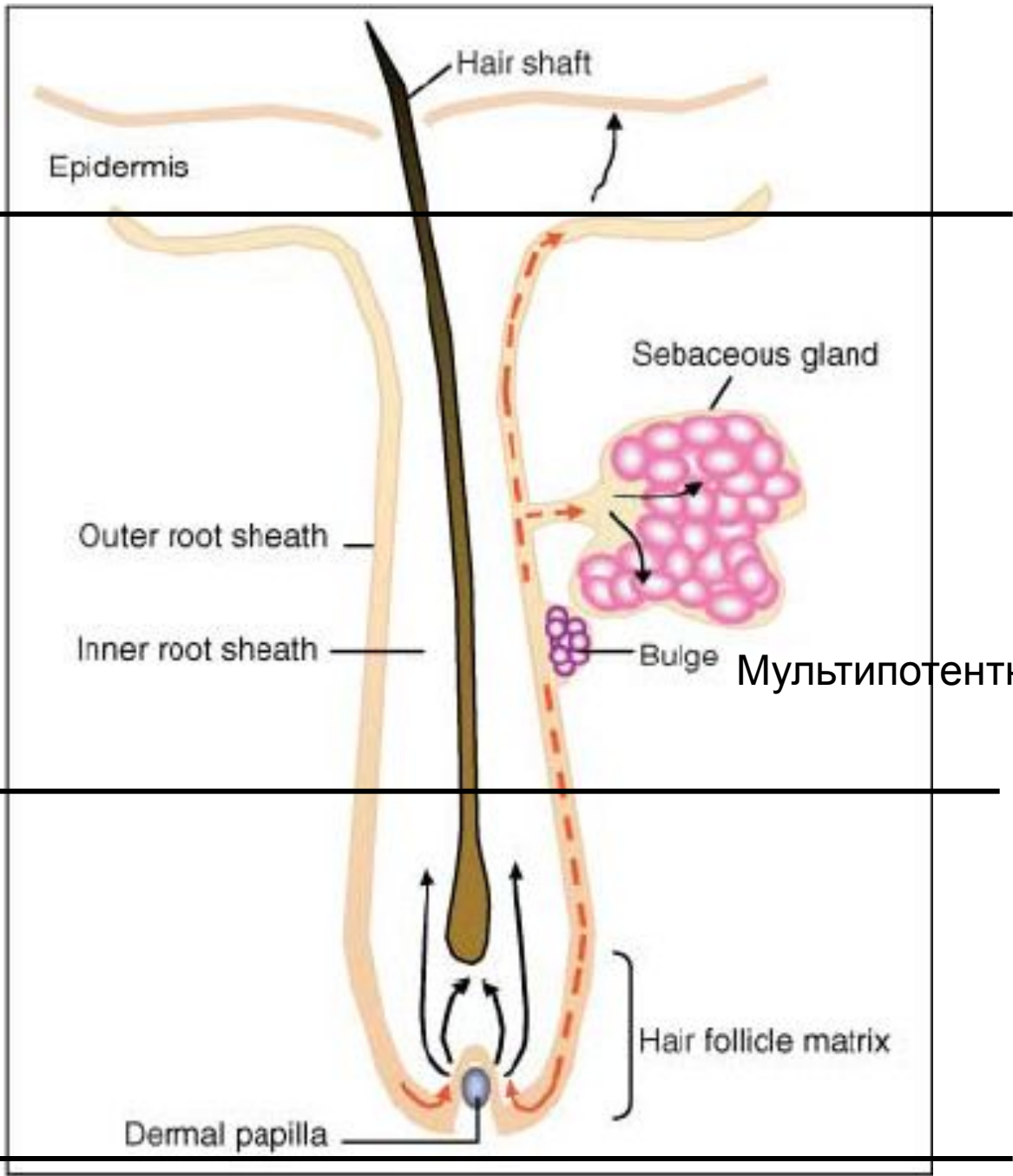
иммуноглобулинов) и моноциты

CD79a и CD19 – В лимфоциты

HLA-DR

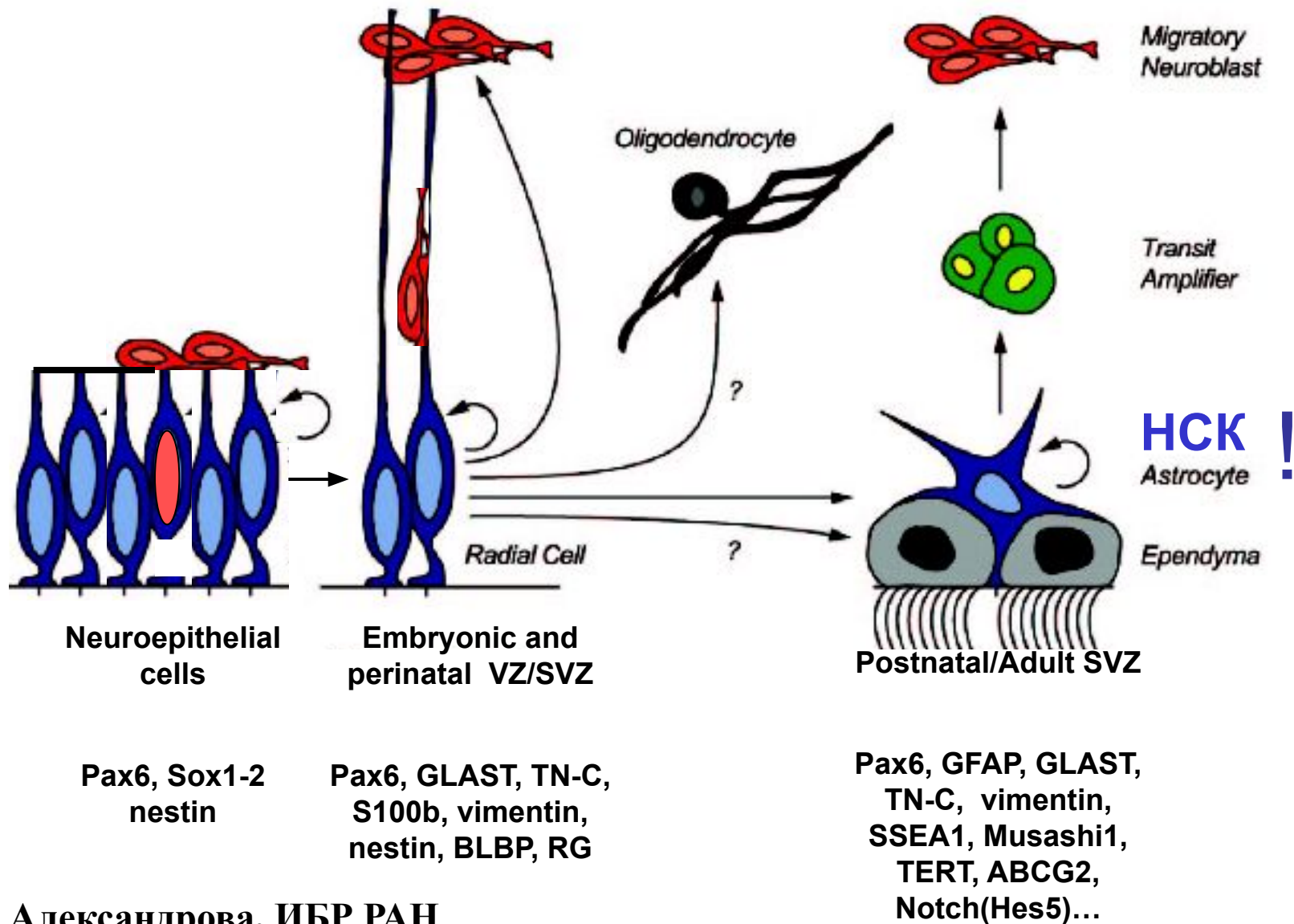
Локализация стволовых клеток в различных типах эпителия (Miller et al., 1993)



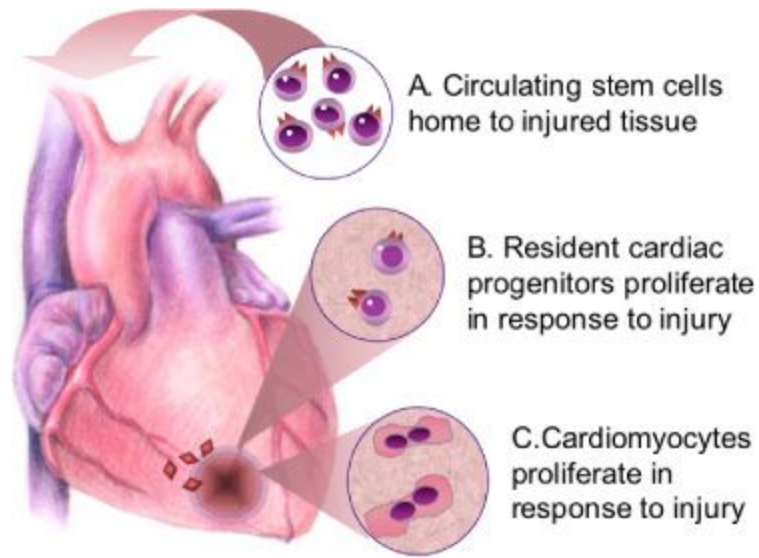


Мультипотентные СК

Цитогенез нейральных стволовых клеток

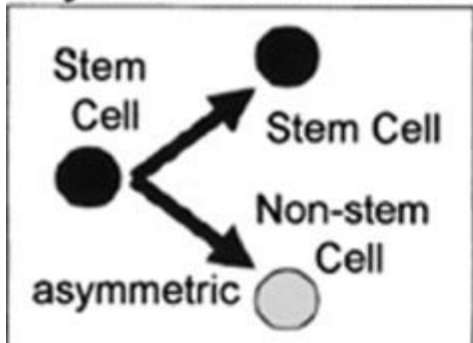


Стволовые клетки сердца

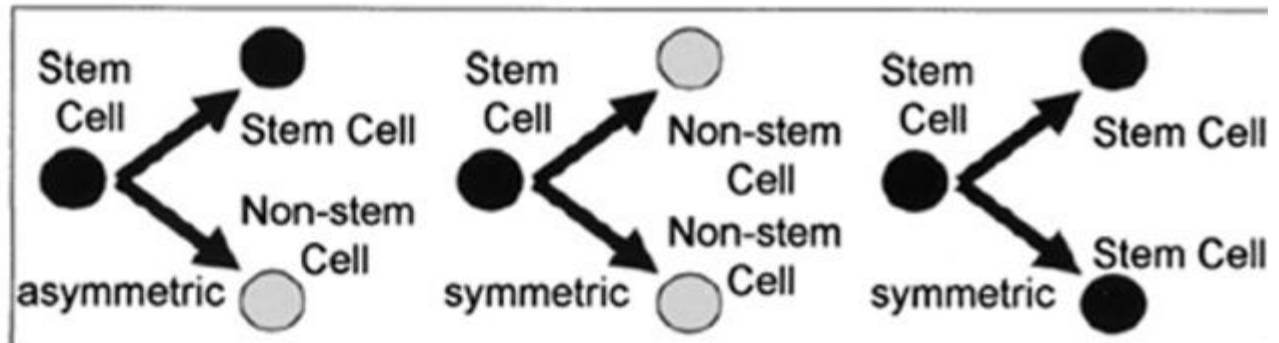


Ассиметричное деление стволовых клеток

**Immortal Stem Cells:
Only
Asymmetrical Divisions**



In A Niche: Symmetric and Asymmetric Divisions



Микроокружение стволовых клеток

- В состав ниши входят окружающие клетки, внеклеточный матрикс и молекулярная среда. В матриксе находятся регуляторные молекулы, в частности факторы роста, интегрины, кадгеринны.

-Ниши хорошо снабжены кровеносными сосудами и нервными окончаниями, и кроме того, обеспечивают физическую защиту.

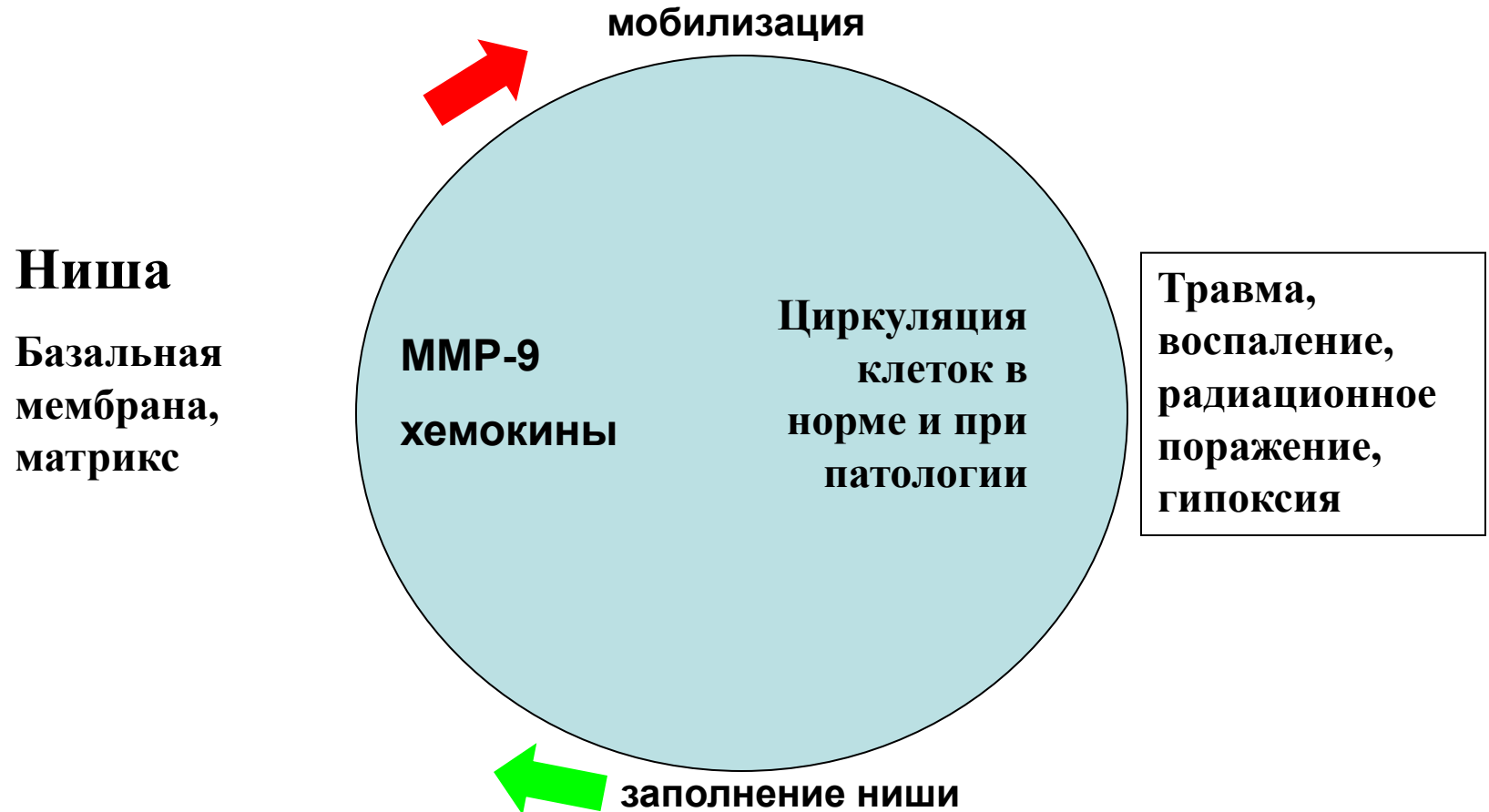
Пластичность тканеспецифических стволовых клеток

- Способность клеток дифференцироваться через границы тканей и зародышевых листков

1. Популяционное разнообразие
2. Слияние клеток
3. Плюрипотентные стволовые клетки

Хоуминг и мобилизация

(онтогенез, регенерация, канцерогенез)



Возможное клиническое применение СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

1. Трофическое влияние на ткани и органы
2. Стимуляция васкуляризации
3. Индукция регенерации
4. Иммунокорректирующие и иммуносупрессивные свойства
5. Противошоковое действие

Результаты использования клеточных технологий

Полученные

Восстановление костного мозга

Кожа (ожоги, раны)

Роговица

Хрящ

Кость

Сосуды

Спинальная травма

Ожидаемые

Нейродегенеративные
заболевания

Инфаркт

Инсульт

Патологии печени

Аутоиммунные
заболевания

Реконструкция
иммунной системы

Диабет

Известные к сегодняшнему дню эквиваленты тканей:

Живой эквивалент кожи

Эквиваленты сосудов

Эквивалент хряща

Эквивалент печени

Эквивалент мочевого пузыря

Эквивалент уретры

Эквивалент роговицы

Взаимодействие стволовых клеток с опухолью

Мобилизация/Хоминг

CXCR4/SDF-1

MCP-1

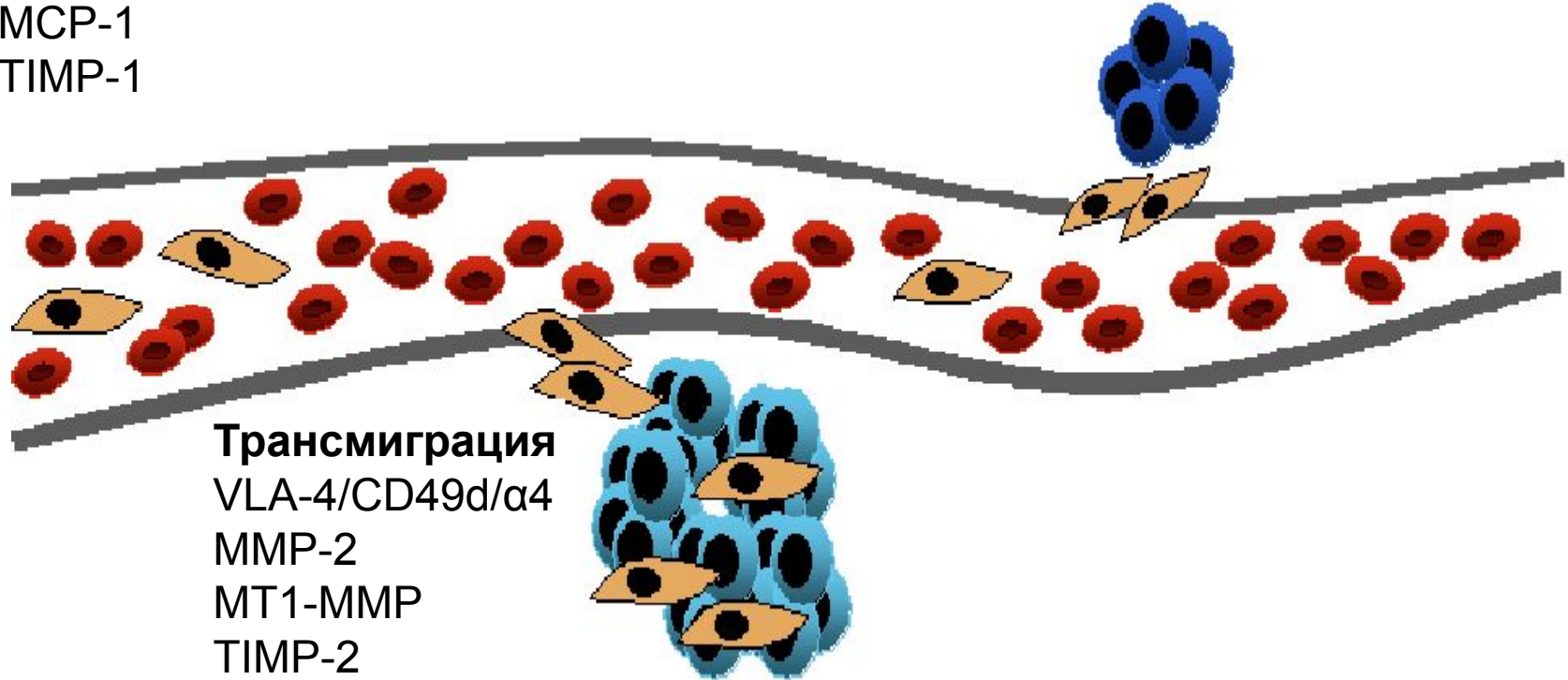
TIMP-1

Метастазы

MCP-1

CCL5/RANTES

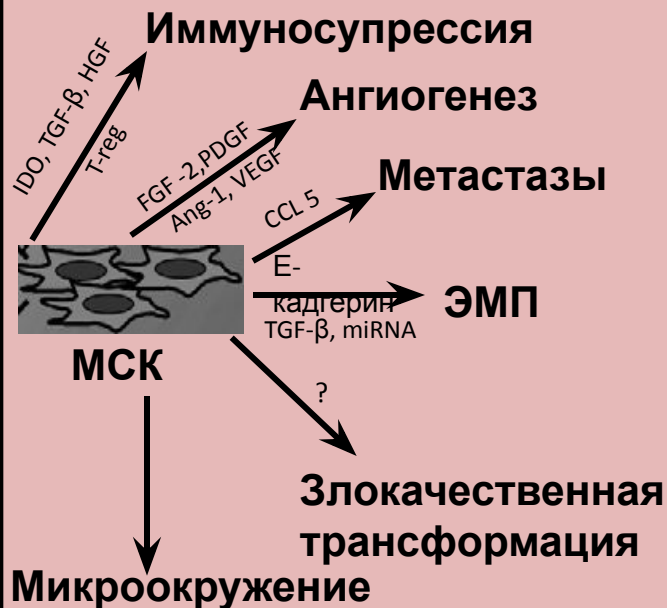
МСК



МСК обладают способностью к миграции и хомингу к опухолям

Фундаментальные исследования

Стимулирующее действие на рост опухоли



Не влияют на рост опухолей

Sasportas et al., 2009
Xia et al., 2011

Ингибирующее действие на рост опухоли



Возможные направления лечебного действия СК

Терапевтическое действие через блокировку механизмов хоминга MSC

Применение MSC для доставки лекарств в опухоль

Создание противоопухолевых клеточных препаратов на основе MSC

Dai et al., 2011
Galderisi et al., 2010

Методы *in vivo* визуализации миграции и распределения экзогенных ММСК

	Разрешающая способность	Что дает использование контрастирующих веществ	Наблюдение новых популяций при делении СК
МРТ	наблюдение отдельных клеток	Достигается хороший контраст, который визуализирует только первичную популяция СК	невозможно
ОЭКТ	наблюдение небольших групп клеток		
ПЭТ	наблюдение небольших групп клеток		

Флуоресцентный имиджинг	наблюдение больших групп клеток	Визуализация обеспечивается за счет генетически-кодируемого красителя, который сохраняется при делении СК	возможно
--------------------------------	---------------------------------	---	----------

Zhao et al., 2010; Reagan et al., 2011

Есть задача изучения **накопления** МСК в опухоли **во времени**, их влияния на опухоль

Методы флуоресцентного имиджинга, использующие **генетически-кодируемые красители**, которые позволяют решить эту задачу

Флуоресцентный имиджинг

на уровне целого организма in vivo



Установка для
поверхностного
флуоресцентного
имиджинга
(ИПФ РАН, Россия)

- Источники: светодиоды
- Цифровая камера Hamamatsu ORCA2
- Конфигурация «на отражении»



IVIS Spectrum (Caliper
Life Sciences, USA)

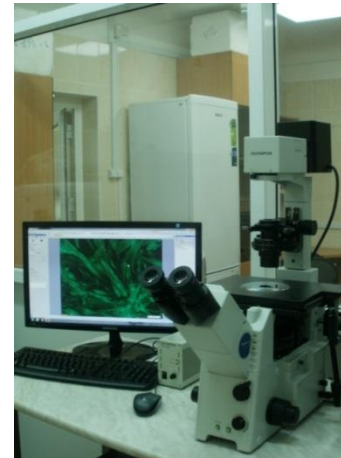
- Источники: широкополосная лампа
- Цифровая охлаждаемая CDD-камера
- Конфигурация «на отражении»
- Флуоресценция и биoluminesценция

на уровне клеток ex vivo



Конфокальный
лазерный сканирующий
микроскоп
LSM 510 (Carl Zeiss,
Germany)

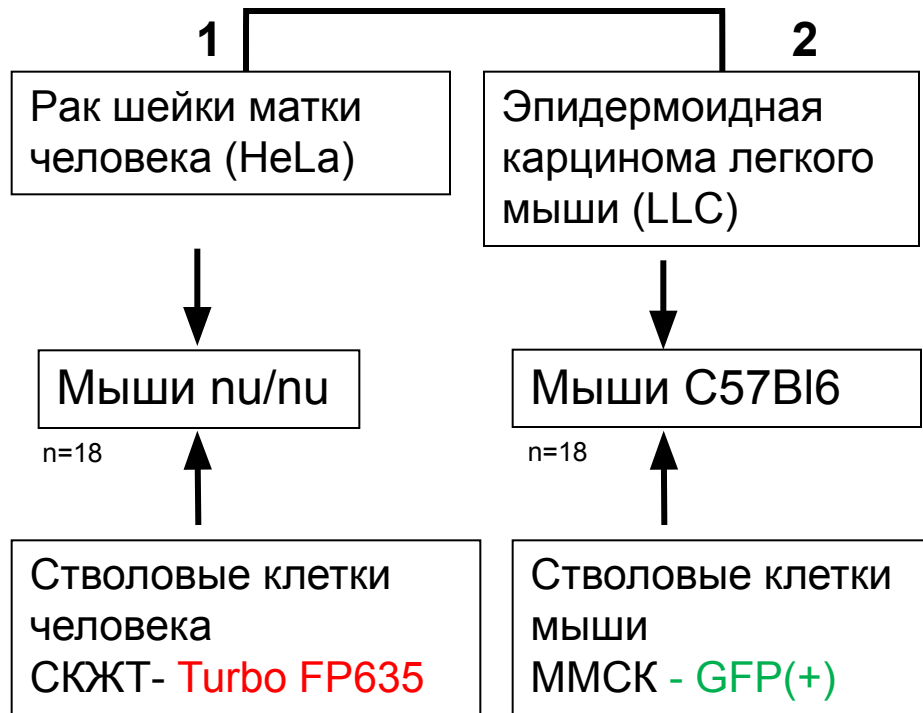
- Моторизованный инвертированный микроскоп Carl Zeiss Axiovert 200 MOT
- Спектральный модуль Carl Zeiss 23 META



Инвертированный
микроскоп X71 (Olympus,
Япония/Германия)

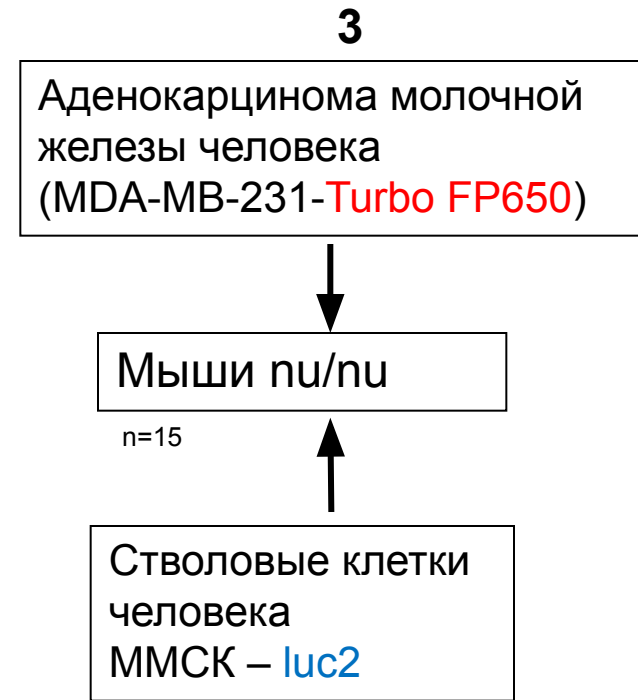
- Комплекс оптической микроскопии, фазового контраста и флуоресценции

Модели подкожного первичного узла



СК вводились локально или внутривенно на 0-й или 8-й день после прививки опухолевых клеток

Модель легочных метастазов



СК вводились внутривенно на 10-й день после инъекции опухолевых клеток

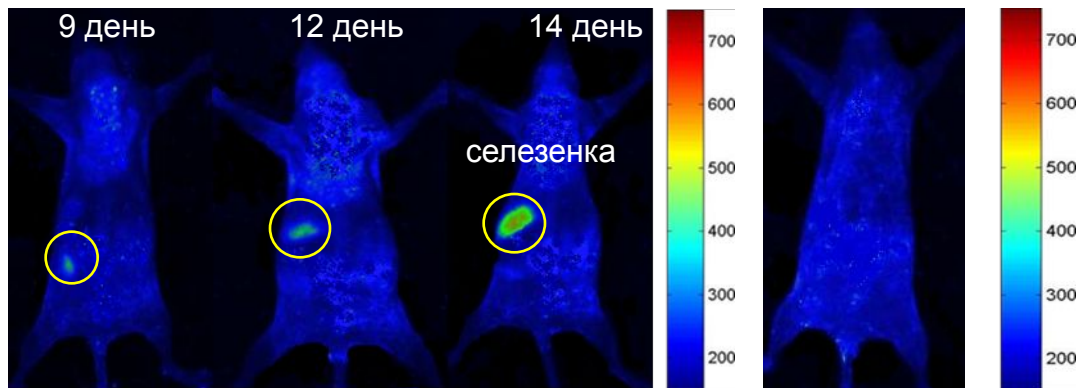
Исследование распределения СК в организме животного-опухоленосителя

Исследование накопления СК в опухоли

Оценка роста первичного узла

Оценка роста метастазов

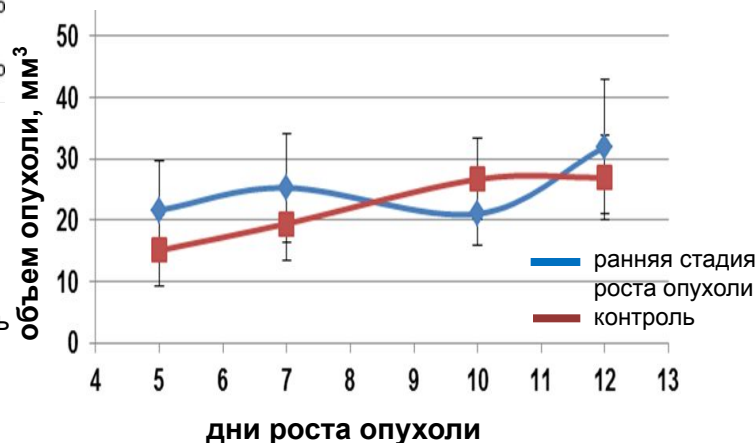
Мониторинг распределения СКЖТ-Turbo FP635 методом флуоресцентного имиджинга *in vivo* и *ex vivo*



Внутривенное введение СКЖТ-Turbo FP635 на 0 день

контроль

Возбуждение - 585 нм
 Детекция - 628-672 нм

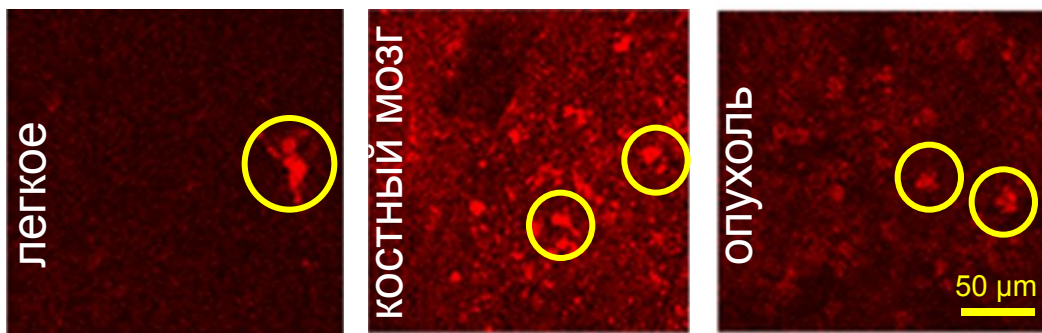


СК не оказывают влияния на рост рака шейки матки человека (HeLa)

Внутривенное введение СКЖТ-Turbo FP635 на 8 день

Локальное введение СКЖТ-Turbo FP635 на 0 день

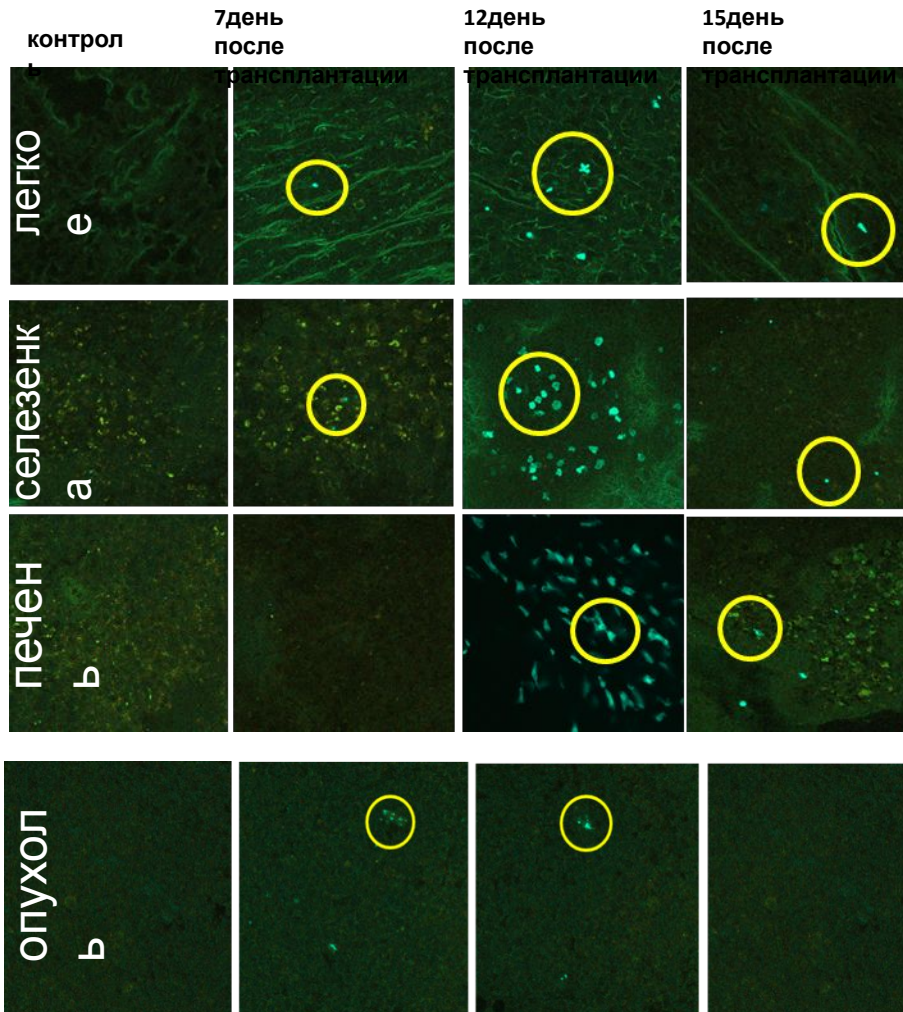
Локальное введение СКЖТ-Turbo FP635 на 0 день



Возбуждение - 543 nm
 Детекция - 650-710 nm

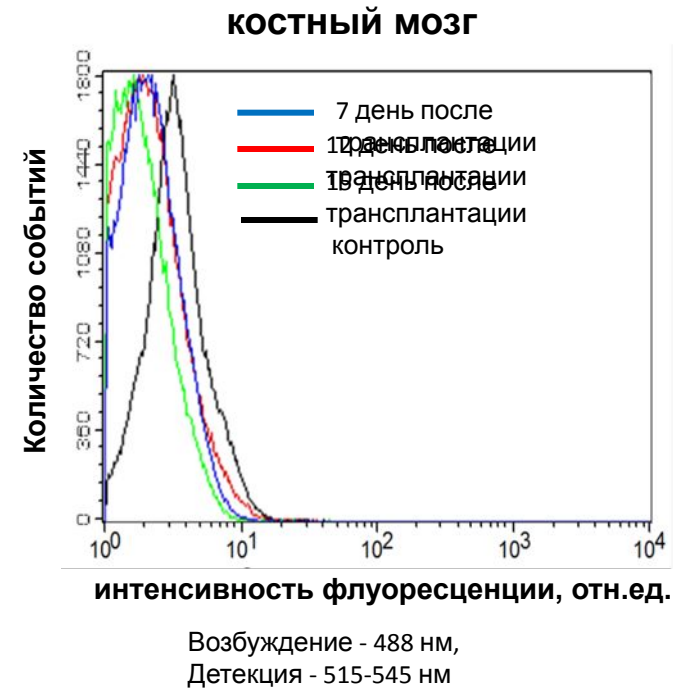
СКЖТ-Turbo FP635
 аккумулируются в опухоли при
 локальном введении

Мониторинг распределения ММСК - GFP(+) методами флуоресцентного имиджинга *ex vivo* и проточной цитометрии



Возбуждение - 488 нм,
Детекция - 490-600 нм

единичные ММСК - GFP(+) накапливаются в опухоли при внутривенном введении, но не пролиферируют

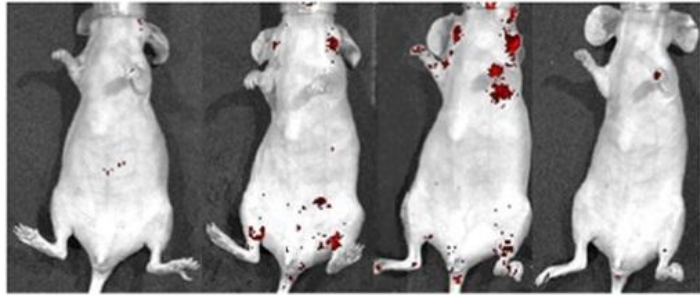


СК не оказывают влияния на рост карциномы легкого мыши

Meleshina A.V. et al.
Proc. SPIE, 2013, Vol. 8587

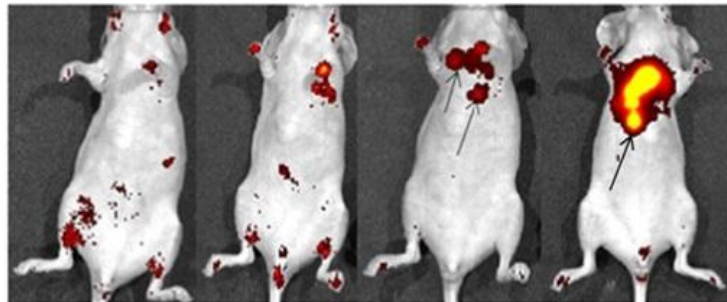
Мониторинг формирования метастазов опухолевыми клетками MDA-MB-231-Turbo FP650 методом флуоресцентного имиджинга in vivo и ex vivo

животные с метастатической опухолью и введением **MMCK – luc2**

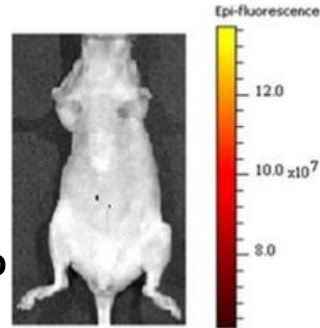


4 неделя 6 неделя 7 неделя 8 неделя

животные с метастатической опухолью без введения **MMCK – luc2**



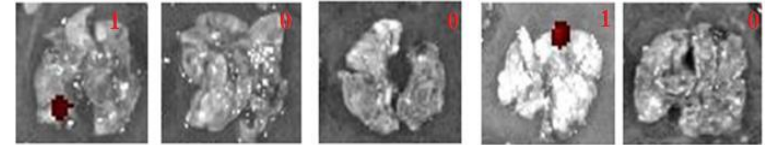
4 неделя 6 неделя 7 неделя 8 неделя



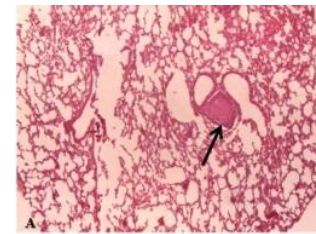
контроль

Возбуждение - 605 нм
Детекция - 660 нм

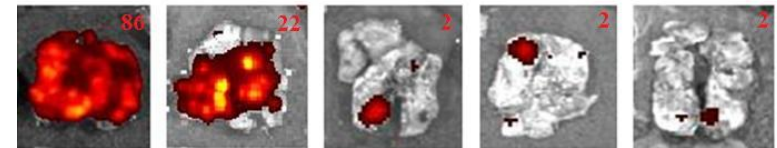
легкие животных с метастатической опухолью и введением **MMCK – luc2**



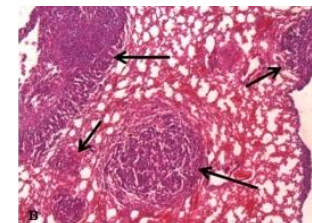
nude 1 nude 2 nude3 nude 4 nude control



легкие животных с метастатической опухолью без введения **MMCK – luc2**

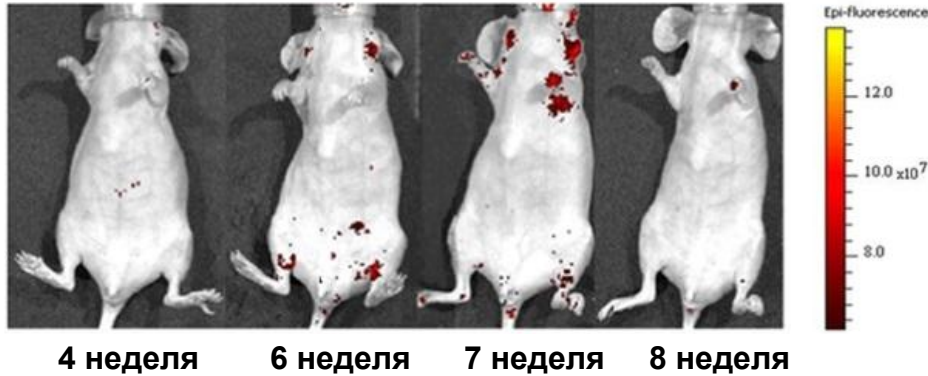


nude 1 nude 2 nude3 nude 4 nude 5

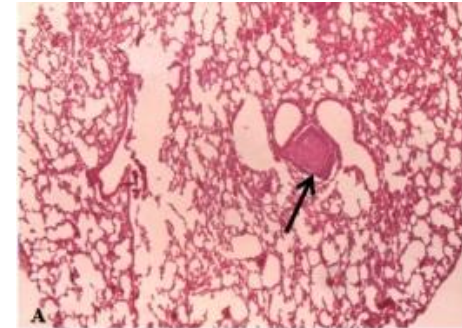


Мониторинг распределения **MMCK – luc2** методами двойного (флуоресцентного и биOLUMиНесцентного) имиджинга

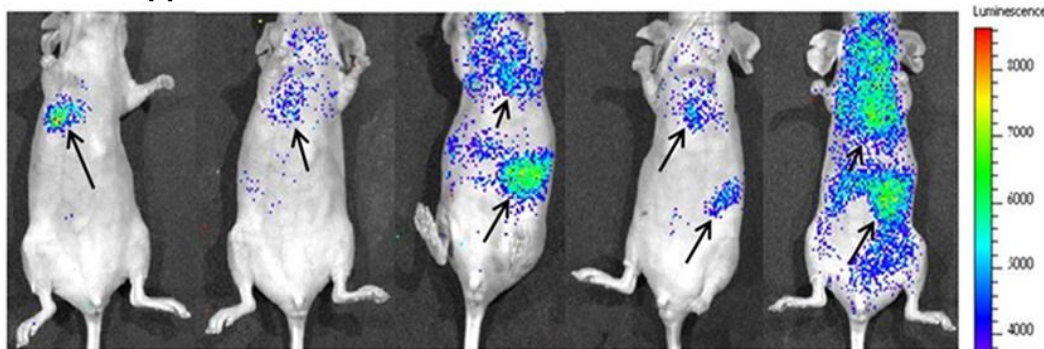
животные с метастатической опухолью и введением **MMCK – luc2**



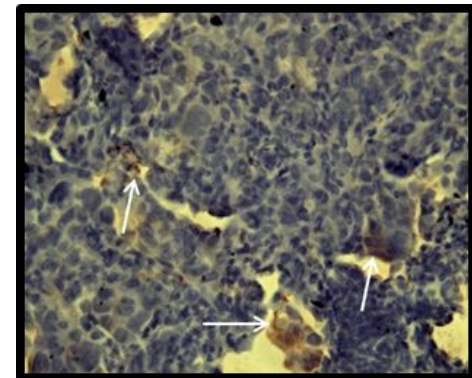
легкие животных с метастатической опухолью и введением **MMCK – luc2**



животные с метастатической опухолью без введения **MMCK – luc2**



иммуногистохимия легочной ткани с метастазами



Окрашивание антителами к

СК ингибируют формирование метастазов карциномы молочной железы человека

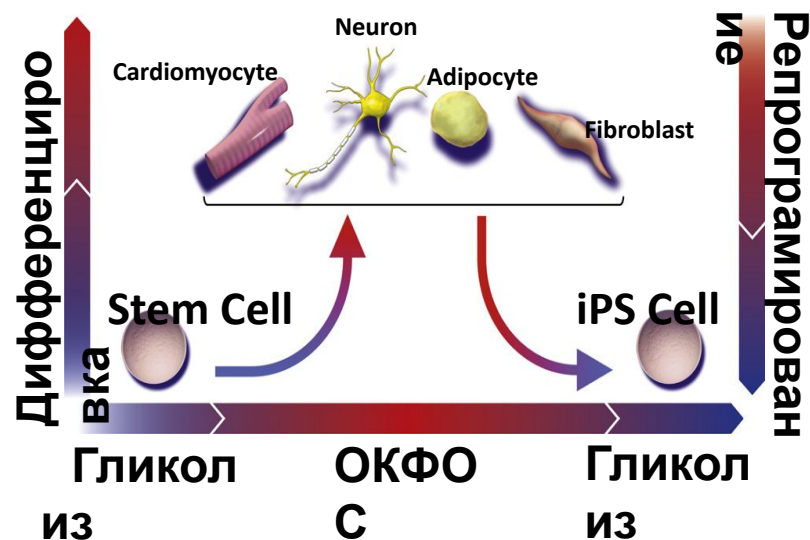
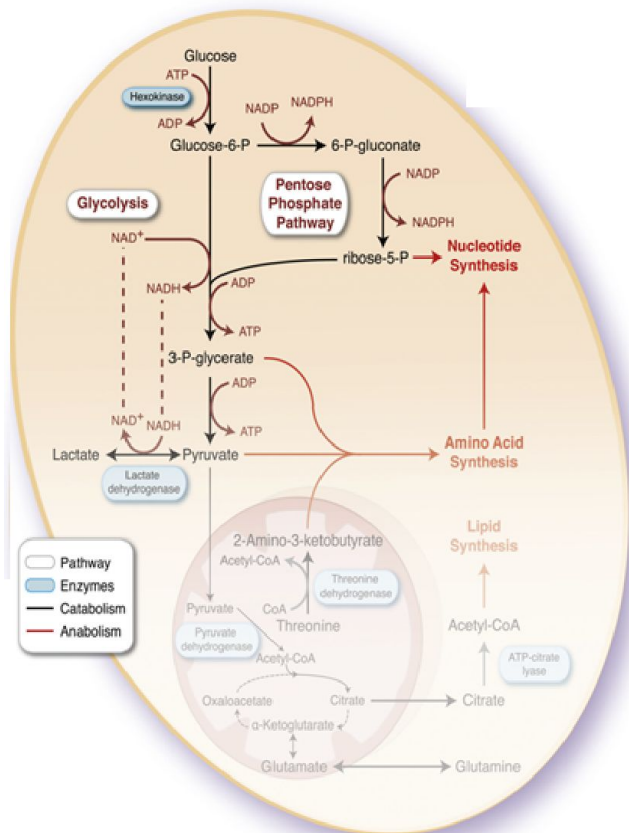
Meleshina A.V. et al. Stem Cell Research & Therapy, (2015) 6:15 ,13287-015

Заключение:

Экзогенные Мезенхимные стволовые клетки:

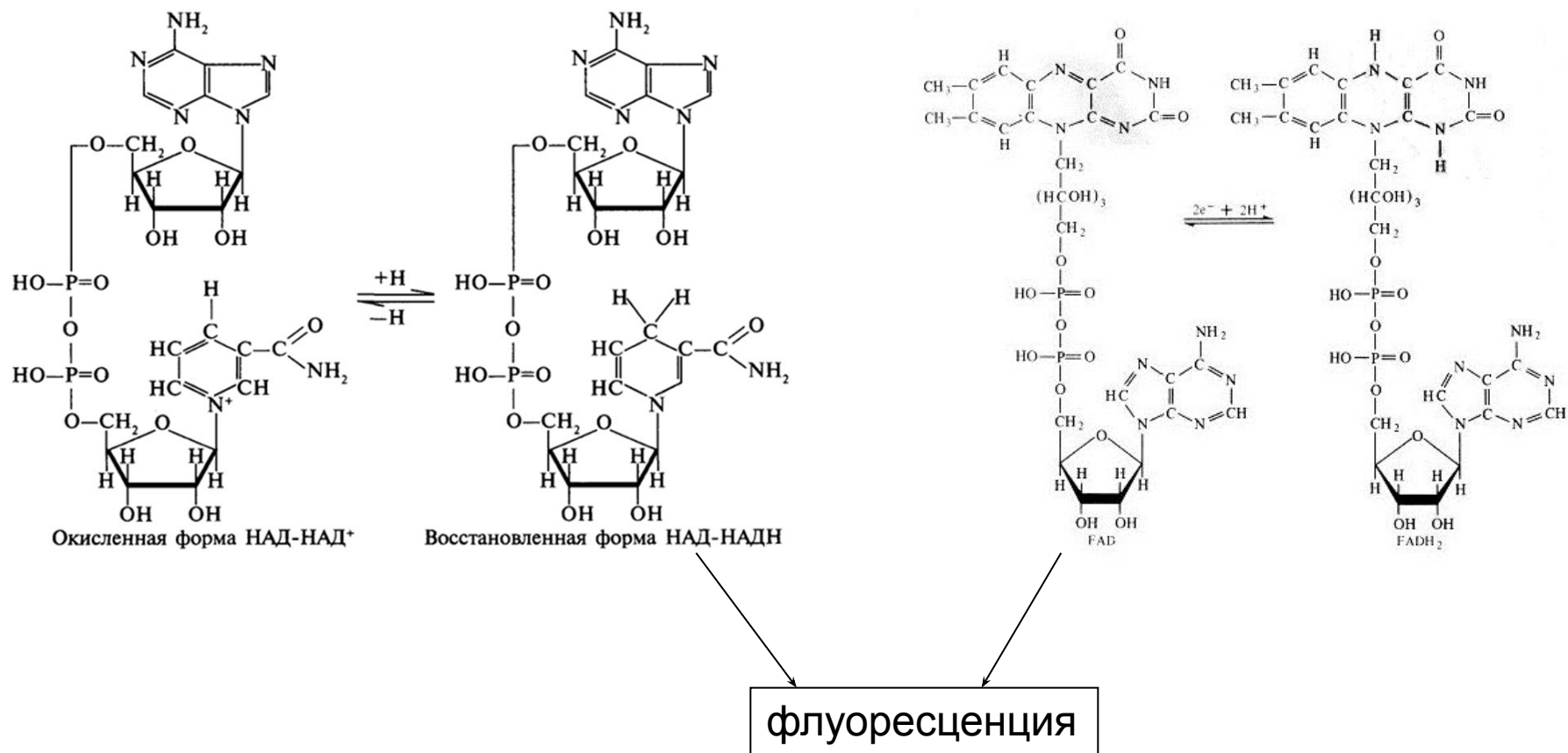
- Не аккумулируются в первичных опухолях и не влияют на опухолевый рост
- Мигрируют в легкие, пролиферируют и ингибируют метастазы

Метаболизм стволовых клеток



- **Проллиферирующие клетки** требуют большого количества энергии (АТФ) и коферментов (НАД(Ф)Н), энергетический распад глюкозы через гликолиз и пентозофосфатный путь
- **Дифференцированные клетки** требуют большого количества энергии для поддержания клеточного гомеостаза и высокоспециализированных функций, продукция АТФ через окислительное фосфорилирование

Внутриклеточные флуорофоры – НАДН и ФАД



Методы исследования морфологии и физиологии стволовых клеток

Признак

К

Клеточные
маркеры

Генотип

П

Потенции к
дифференцировкам

Метод

Д

- Проточная цитометрия
- Иммуногистохимия
- иммуно-сортиг клеток с помощью магнитного поля
- Полимеразная цепная реакция
- Иммуоцитохимия
- **F**luorescence **L**ifetime **I**maging **M**icroscopy (**FLIM**)

Неинвазивность

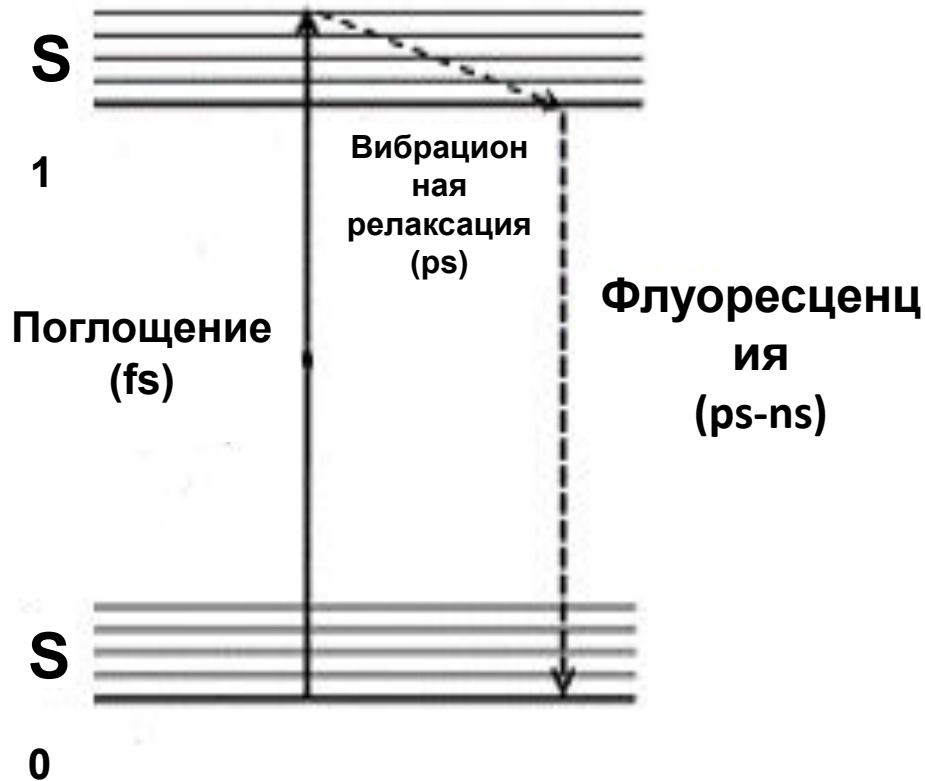
Высокая чувствительность и специфичность

Информативность

Не требует экзогенных маркеров

Позволяет в течение длительного времени изучать функциональные изменения

Принцип метода FLIM микроскопии



Флюорофоры

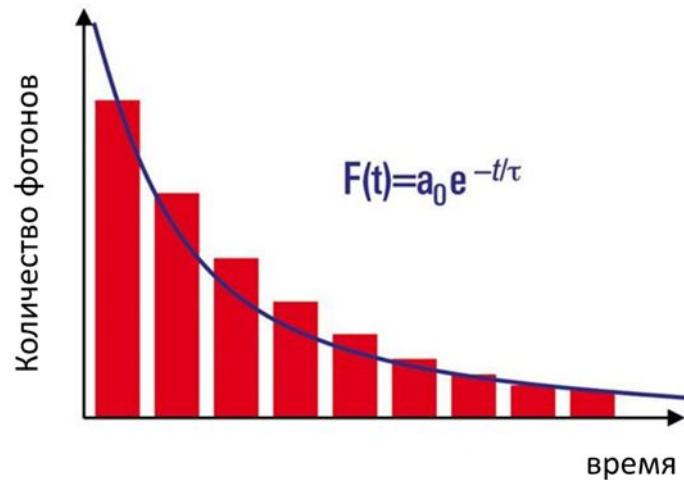
Эндогенные

- Коллаген
- Эластин
- Триптофан
- Пироксидин
- НАДН+Н⁺
- ФАД

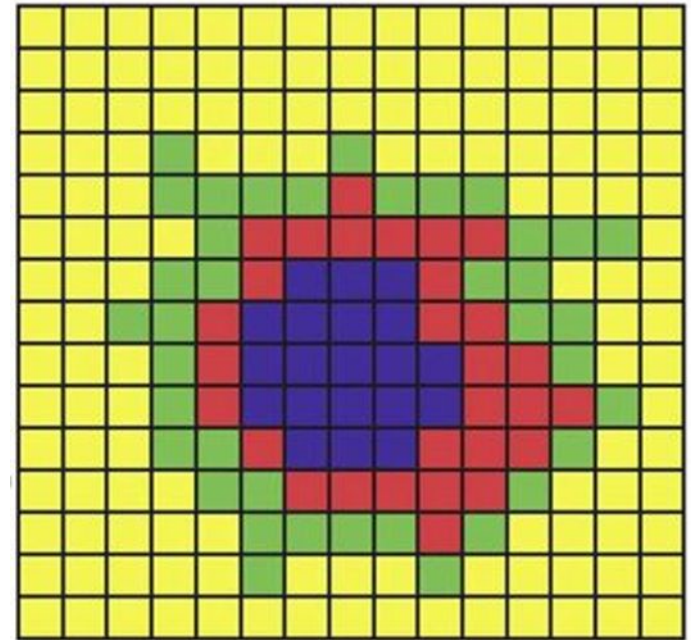
Экзогенные

- Флуоресцентные белки и красители (MitoTracker, GFP, RFP)

Принцип метода FLIM микроскопии



Распределение времен жизни флуоресценции описывается экспоненциальной функцией затухания



Визуализация времени жизни флуоресценции

Материалы и методы

- **МСК** – мезенхимные стволовые клетки костного мозга человека

0
день

Недифференцированные
МСК

(МОНОСЛОЙ)

7
день

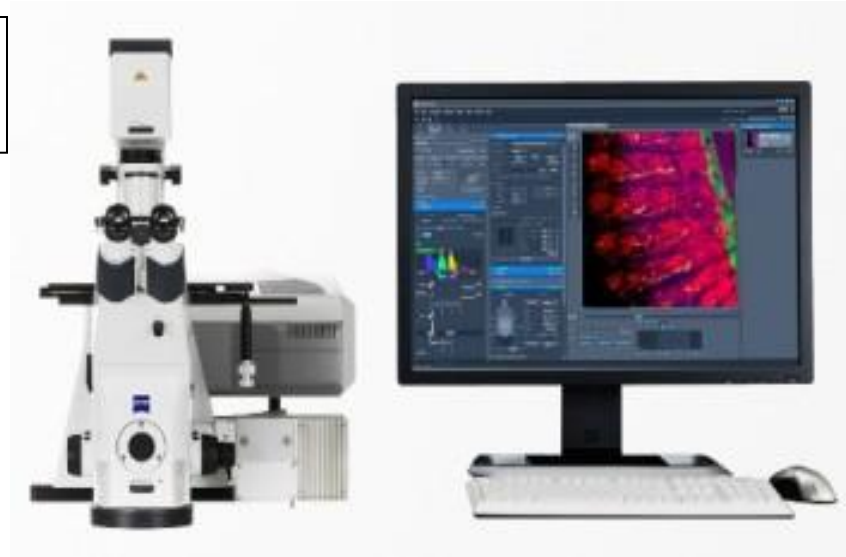
ь

Адипогенная,
остеогенная,
хондрогенная
дифференцировки

14
день

21
день

Дифференцированны
е
клетки



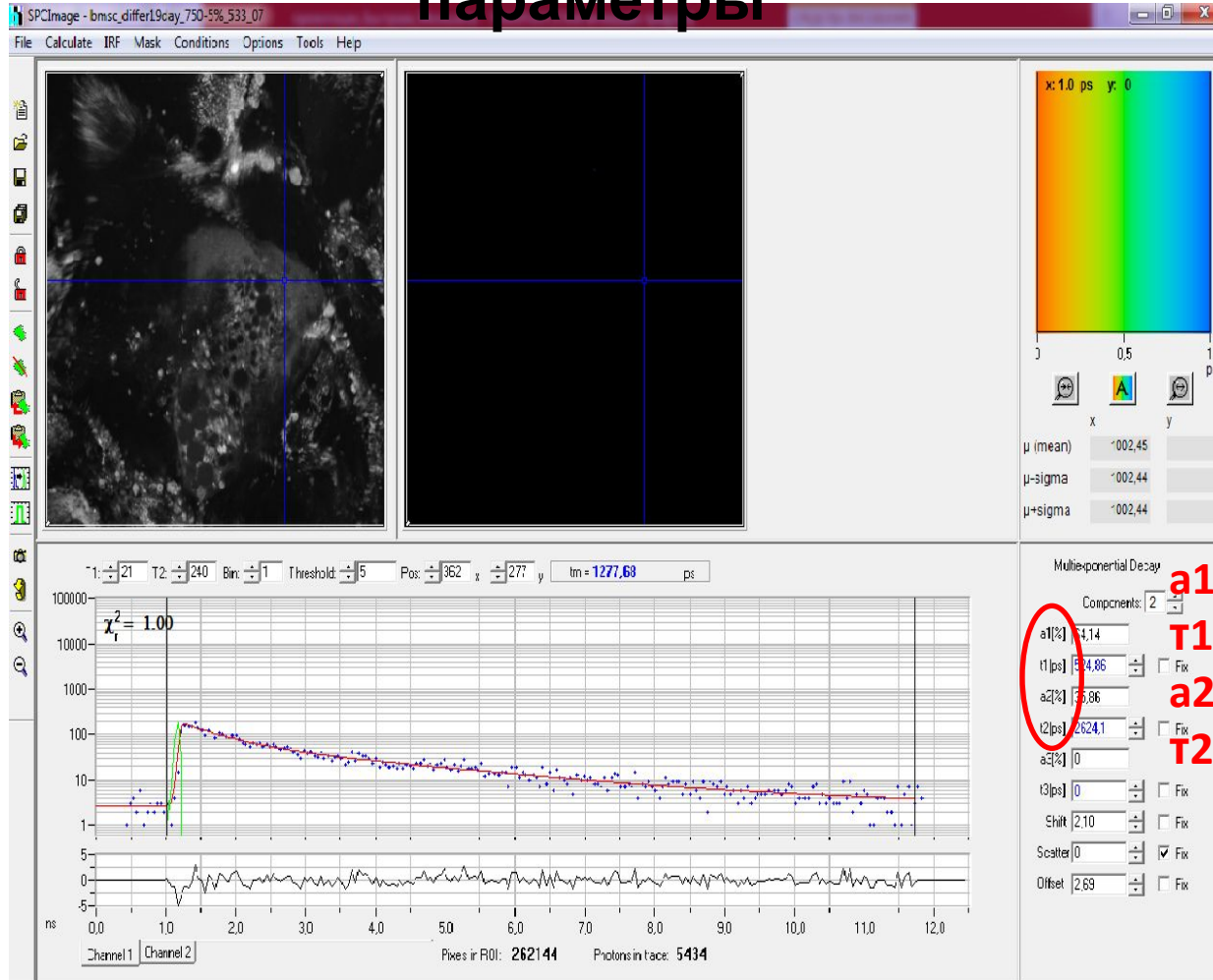
LSM 710 лазерный сканирующий
конфокальный микроскоп
(Carl Zeiss, Germany)
FLIM система на основе
Simple Tau 152 TCSPC system
(Becker & Hickl GmbH)

Никотинамид аденин динуклеотид (фосфат), НАД(Ф)Н: возбуждение - 750 нм, детекция - 455-500 нм

Флавин аденин динуклеотид, ФАД: возбуждение - 900 нм, детекция - 500-550 нм

Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy

Регистрируемые FLIM параметры



a1 (%) – вклад короткой компоненты во время жизни флуоресценции

t1 (ps) – время жизни флуоресценции короткой компоненты, соответствует **времени жизни свободной формы НАД(Ф)Н**

a2 (%) – вклад длинной компоненты во время жизни флуоресценции

t2 (ps) – время жизни флуоресценции длинной компоненты, **соответствует времени жизни связанной формы НАД(Ф)Н**

Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy

Регистрируемые FLIM параметры

Свободная форма НАД(Ф)Н

растворенная форма кофермента
цитозоль

- $0,3 \pm 0,05$ нс

гликолиз

Связанная форма НАД(Ф)Н,

форма кофермента, который входит в
состав апофермента,
связан с белками
на мембране митохондрий

- $2,0 \pm 0,3$ нс

ОКФОС

Разделение времен жизни связанных форм НАДН и НАД(Ф)Н при адипогенной дифференцировке



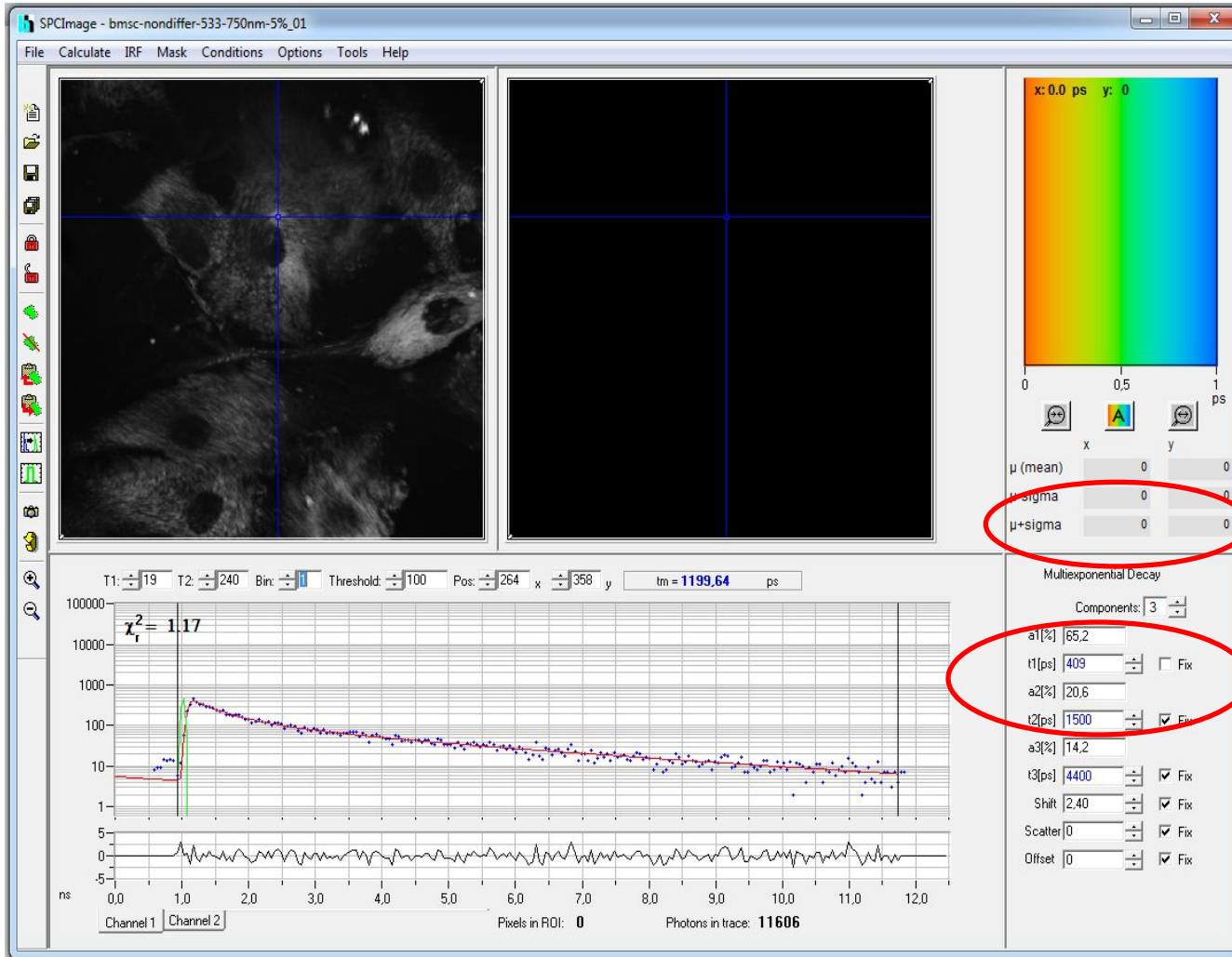
Связанная форма
 ↙ НАДН ↘

нефосфорилирован
НАДН - акцептор электронов в процессе гликолиза и донор электронов при окислительном фосфорилировании

фосфорилирован
НАД(Ф)Н - играет важную роль в процессах биосинтеза (липидов, аминокислот и нуклеотидов) и окислительном стрессе

Fluorophore	Peak single-photon excitation wavelength (nm)	Peak two-photon excitation wavelength (nm)	Peak single-photon emission wavelength (nm)	Peak two-photon emission wavelength (nm)
NADH (bound)	335–350	690–730	440–450	440–450
NADH (free)	335–350	690–730	450–470	450–460
NADPH	335–350	690–730	450–470	450–460
FAD (bound)	365, 455	700–730	515–525	515–525
FAD (free)	375, 450	700–730	515–525	515–525

Разделение времен жизни связанных форм НАДН и НАД(Ф)Н при адипогенной дифференцировке



t2 (ns) – время жизни флуоресценции длинной компоненты, соответствует времени жизни связанной **нефосфорилированной формы НАДН**

t3 (ns) – время жизни флуоресценции длинной компоненты, соответствует времени жизни связанной **фосфорилированной формы НАДН**

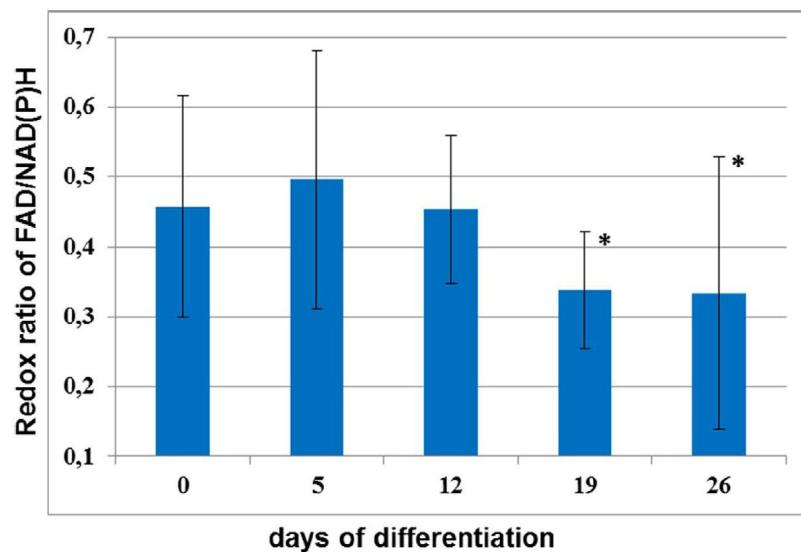
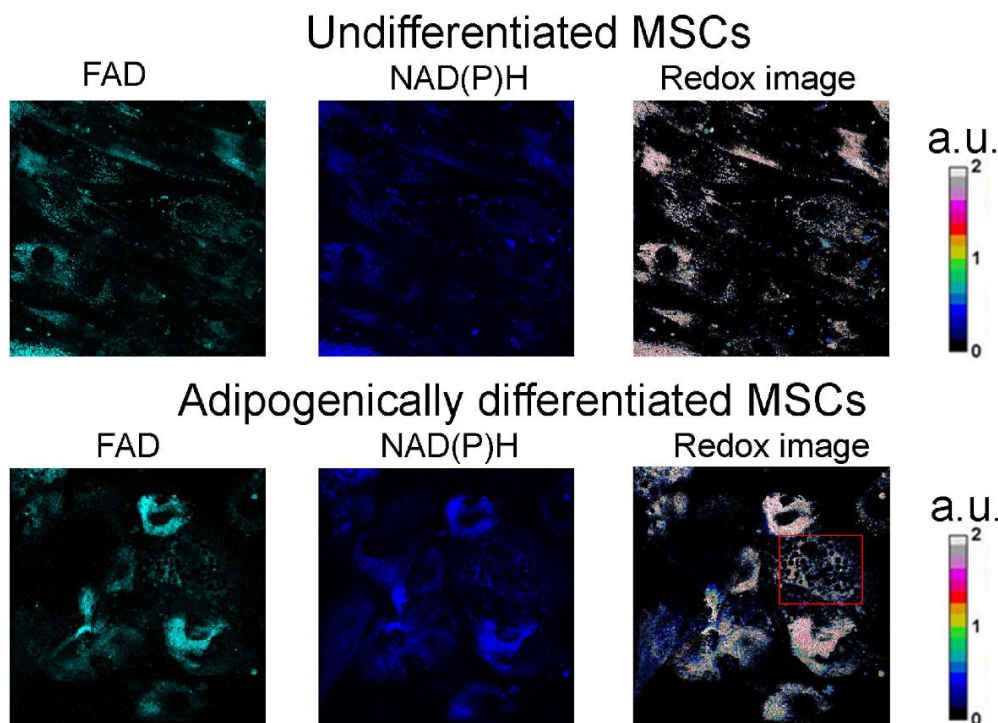
a2 (%) – вклад длинной компоненты во время жизни флуоресценции соответствует вкладу **связанной нефосфорилированной формы НАДН**

a3 (%) – вклад длинной компоненты во время жизни флуоресценции соответствует вкладу **связанной фосфорилированной**

Исследование окислительно-восстановительного статуса МСК в процессе адипогенной дифференцировки методом LSM

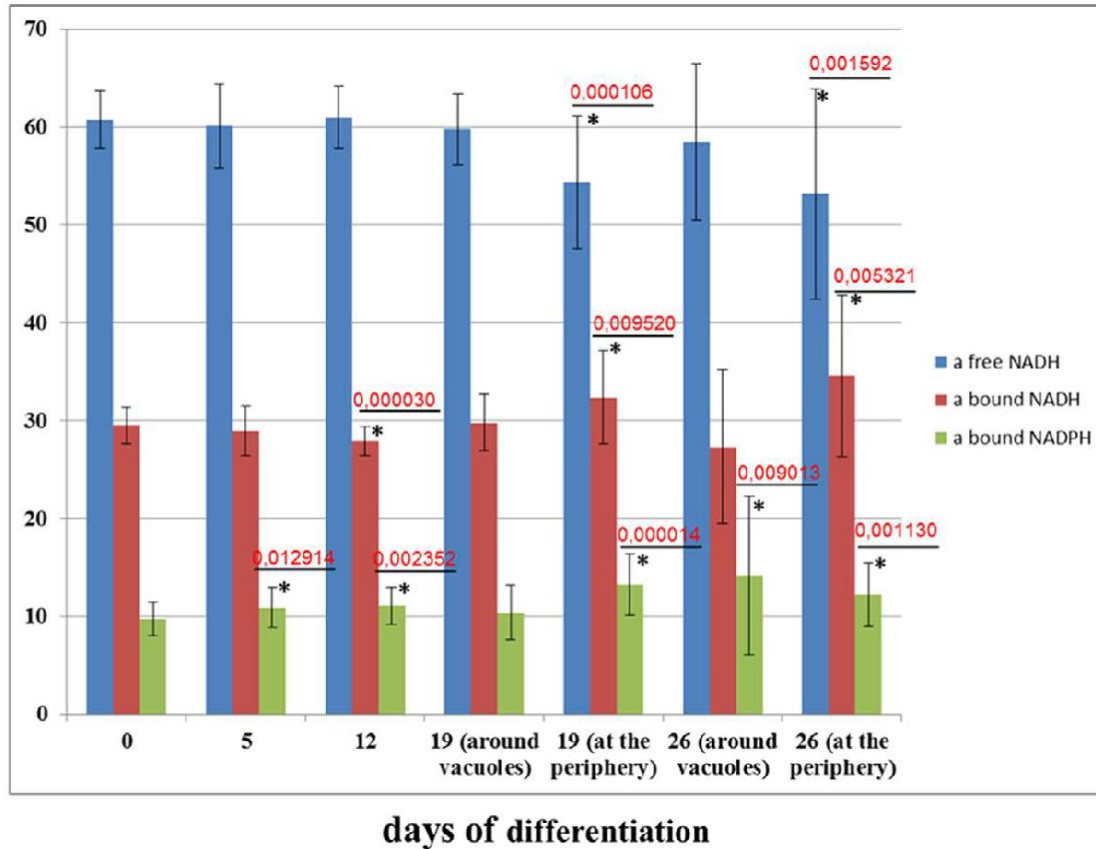
Окислительно-восстановительный коэффициент =

отношение интенсивностей флуоресценции **ФАД/НАД(Ф)Н**



**Увеличение
метаболической активности**

Исследование метаболического статуса и синтеза жирных кислот в МСК в процессе адипогенной дифференцировки методом FLIM

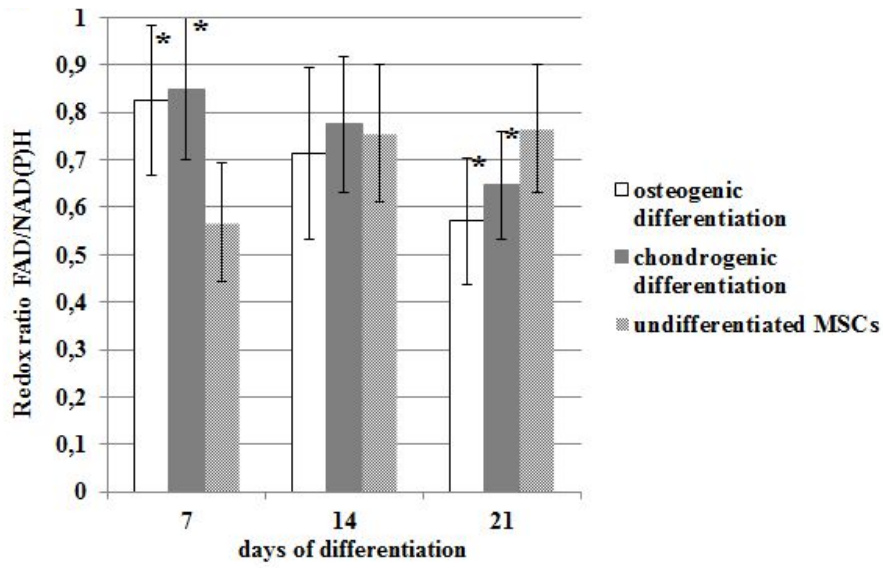
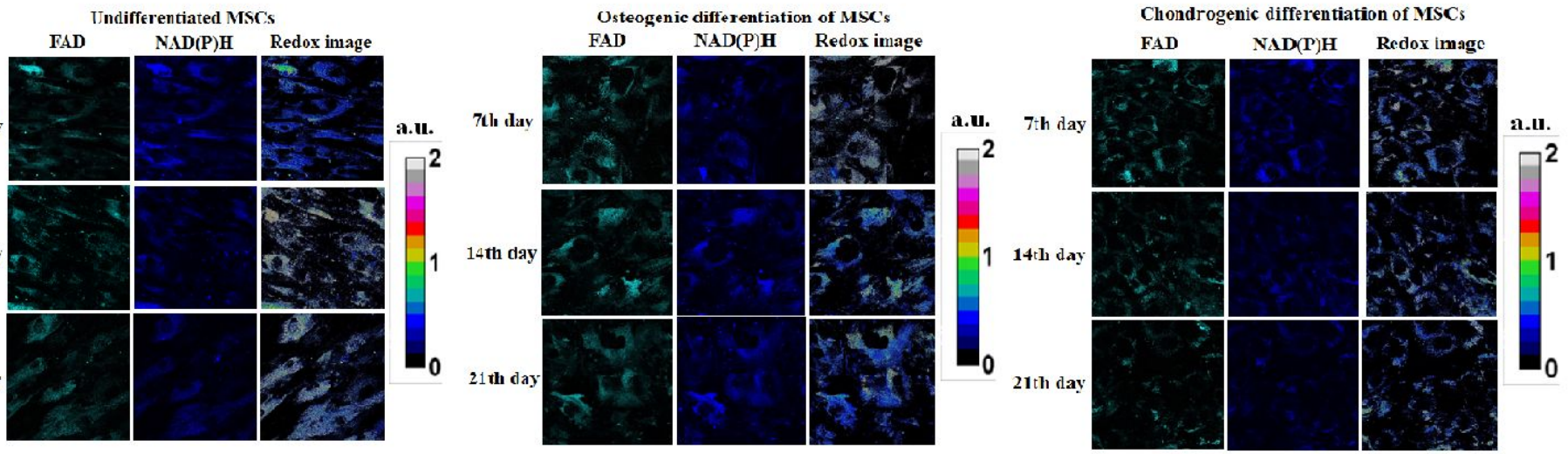


↑ связанной формы НАДН
 =
 переход на ОКФОС

↑ связанной формы НАД(Ф)Н
 =
 активация синтеза липидов

Исследование окислительно-восстановительного статуса МСК в процессе остеогенной и хондрогенной дифференцировок методом LSM

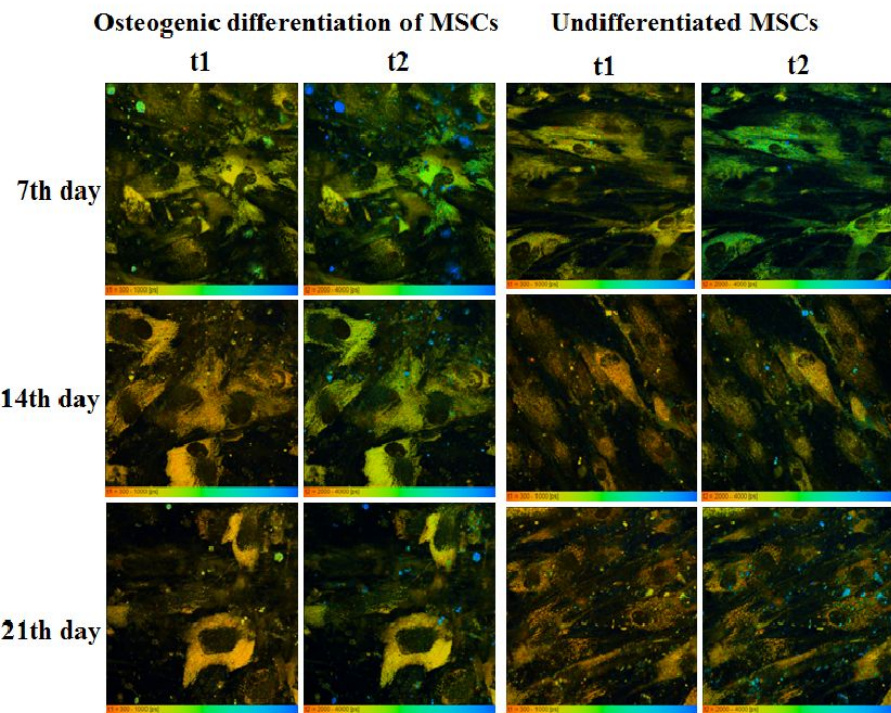
a



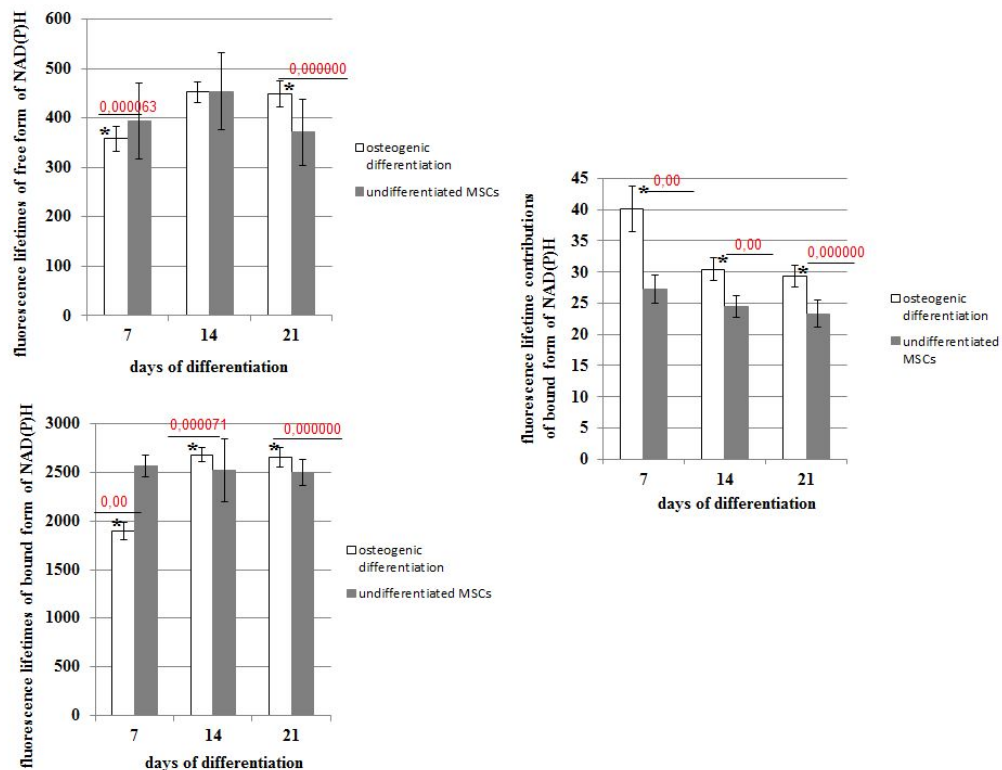
**Увеличение
метаболической активности**

Исследование метаболического статуса в МСК в процессе остеогенной дифференцировки методом FLIM

a



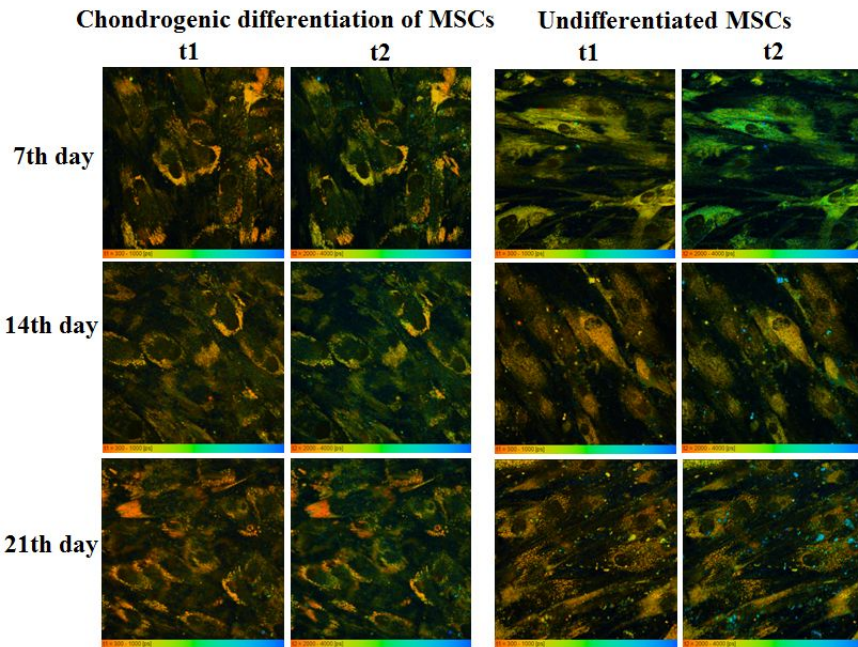
b



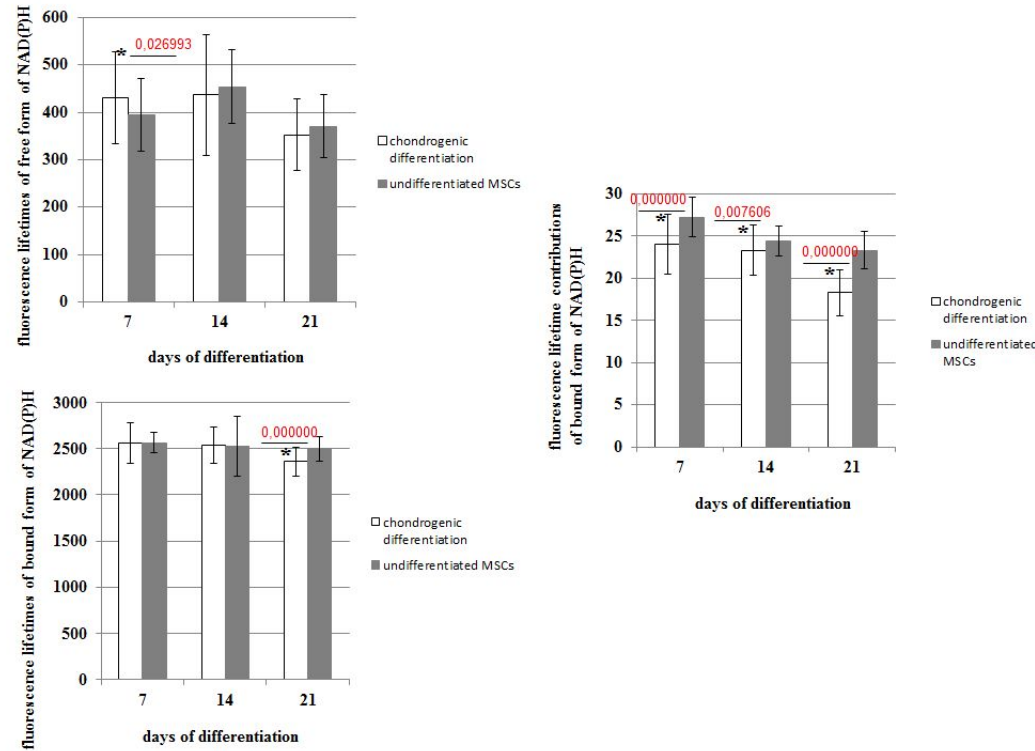
↓ связанной формы НАДН
=
переход на гликолиз

Исследование метаболического статуса в МСК в процессе хондрогенной дифференцировки методом FLIM

a



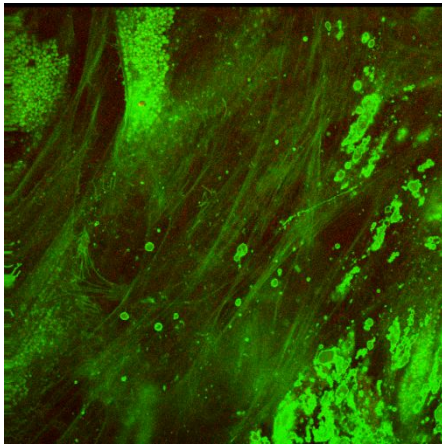
b



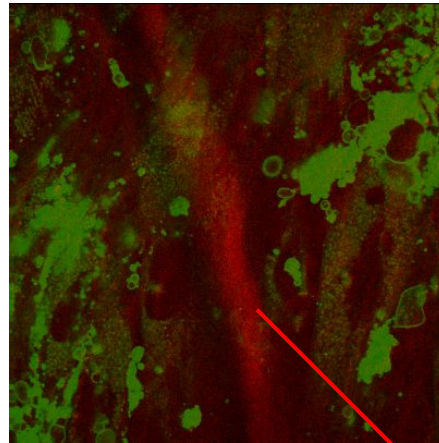
↓ связанной формы НАДН
=
переход на гликолиз

Исследование синтеза коллагена в МСК в процессе остеогенной и хондрогенной дифференцировок методом LSM и FLIM

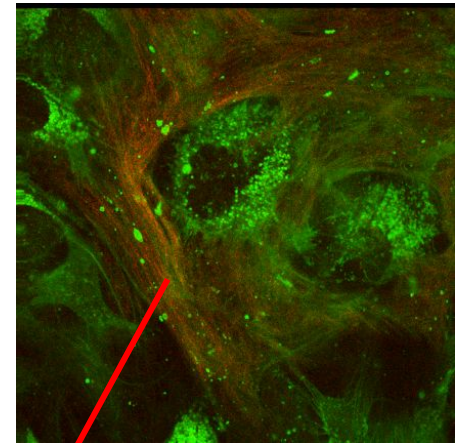
Недифференцированные МСК



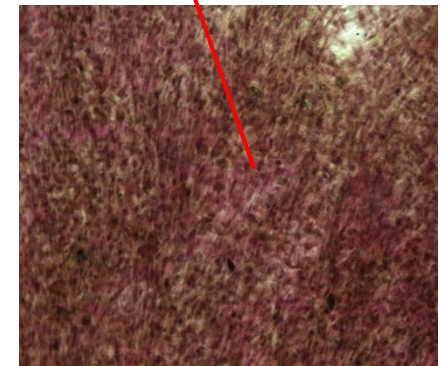
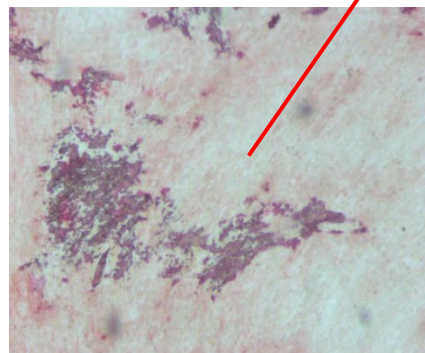
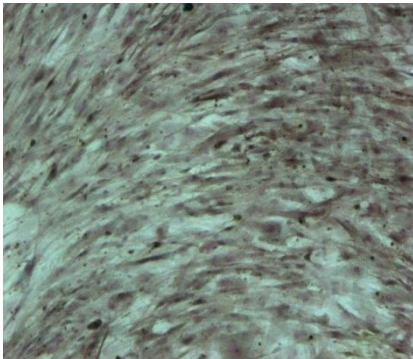
Остеогенная дифференцировка 21й день



Хондрогенная дифференцировка 21й день

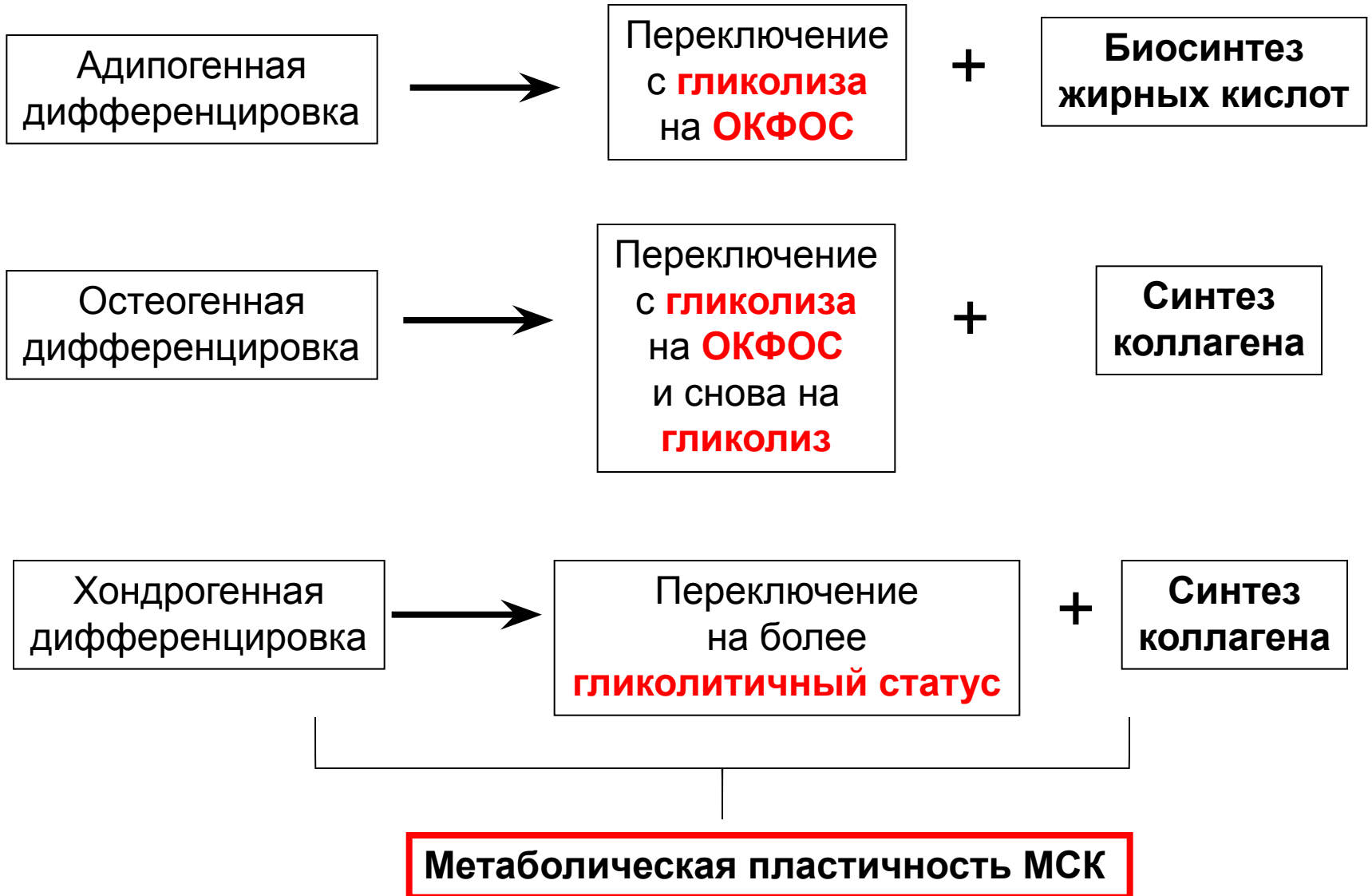


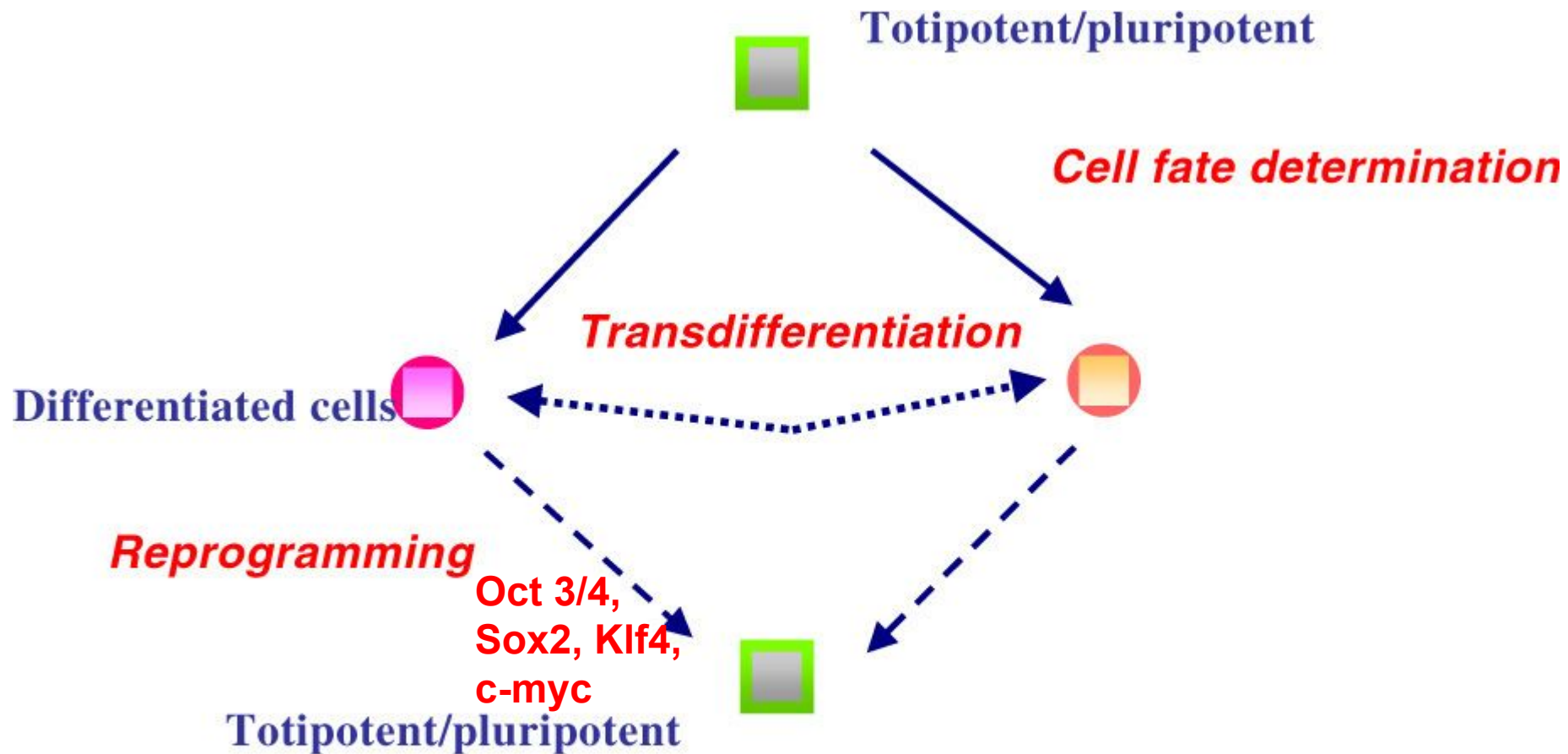
Синтез коллагена



Окрашивание на коллаген по Ван Гизону

Заключение





Индукцированная плюрипотентность (iPS cells)

K. Takahashi,....., S. Yamanaka, 2007, Cell