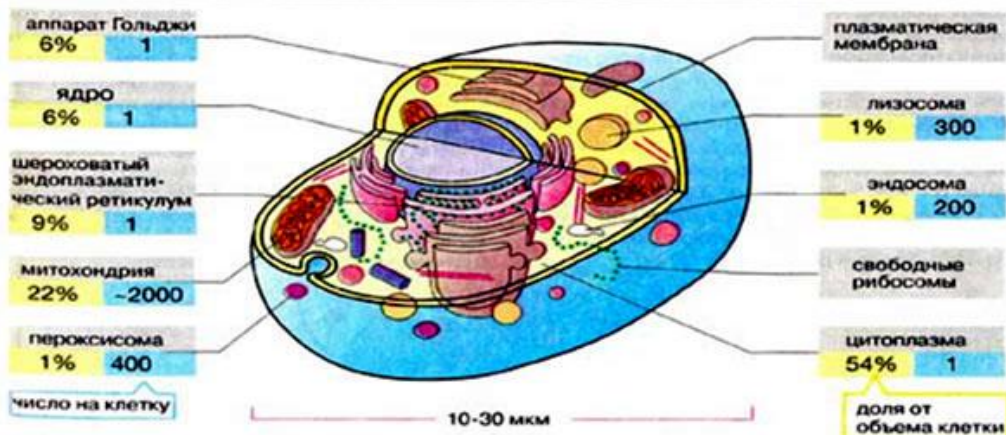


*Клеточные технологии в медицине,  
фармации и биотехнологии*

Прокариоты	Эукариоты	
 1 - 10 мкм зубактерии архебактерии	грибы растения животные	
Организмы		
Форма организма одноклеточные	одно- или многоклеточные	
Органеллы, цитоскелет, аппарат клеточного деления отсутствует	присутствует, сложный, специализированный	10-100 мкм
маленькая, кольцевая, нет интронов, плазмиды	большая, в клеточных ядрах, много интронов	<b>DNA</b>
простой, в цитоплазме	сложный, в ядрах	<b>RNA: синтез и созревание</b>
простой, связанный с синтезом RNA	сложный, в цитоплазме и полости гЕР	<b>Белки: синтез и процессинг</b>
анаэробный или аэробный, легко перестраивающийся	преимущественно аэробный	<b>Обмен веществ</b>
нет	различные формы	<b>Эндоцитоз и экзоцитоз</b>

#### А. Сравнение прокариот и эукариот

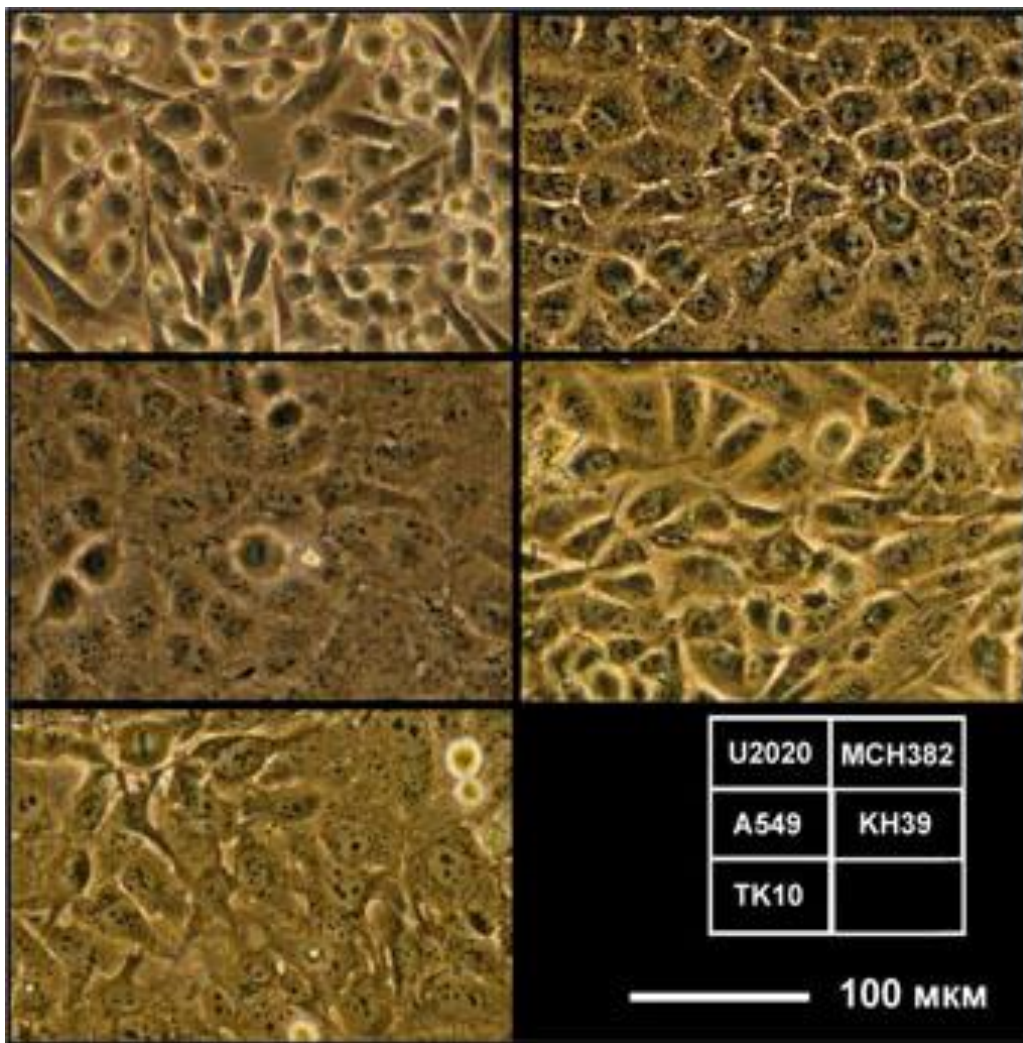


#### Б. Структура животной клетки

# Культивирование клеток

## Методики

- получения клеток, свободных от экзогенных прокариотов и грибов.
- разработки среды, в которых рост клеток не подавляется.
- наблюдения за клетками в динамике их развития.
- непрерывного культивирования культур клеток животных *in vitro* и поддержания их свободными от других биологических агентов.



**Микрофотографии  
клеточных линий  
(фото предоставлены  
д.б.н. Е.Е. Егоровым,  
ИМБ РАН):**

**U2020- мелкоклеточный  
рак легких;  
A549 - карцинома  
легкого человека;  
TK10 - карцинома почки;  
MCH 382 – саркома;  
KN39 – опухолевые  
клеток почки**

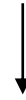
# **Введение клеток в культуру, их происхождение**

**культура клеток**



**культура разобщенных клеток**

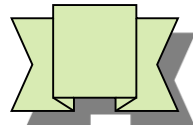
**культура органов и тканей**



**органные культуры**

**Однослойная культура**

*(клетки прикреплены к твердой поверхности)*

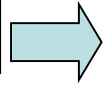


**Суспензионная культура**

*(клетки или конгломераты клеток во взвешенном состоянии в жидкой среде).*

**Клеточная трансплантация и тканевая инженерия**

**Первичная культура**



Культура, состоящая из органов, эксплантов или клеток, извлеченных из организма (опухолевые клетки, образованные культивировавшимися клетками, введенными животным)

**Пассированная культура**



Культура, подвергавшаяся переносу из одного сосуда в другой.

**Постоянная клеточная линия**



Культура после нескольких пересевов



Культуры из эмбриональных и взрослых тканей

Уменьшение размера клеток, округление, увеличение ядерно-цитоплазматического отношения, снижение зависимости от сыворотки или субстрата, увеличение гетеропloidности и анеупloidности, увеличение опухолеродности

# Трансформация



Наследуемое изменение ростовых свойств культивируемых клеток, вызванное различными факторами (новым генетическим материалом, химическими агентами, облучением) или неизвестными причинами.

Вирусная

Спонтанная

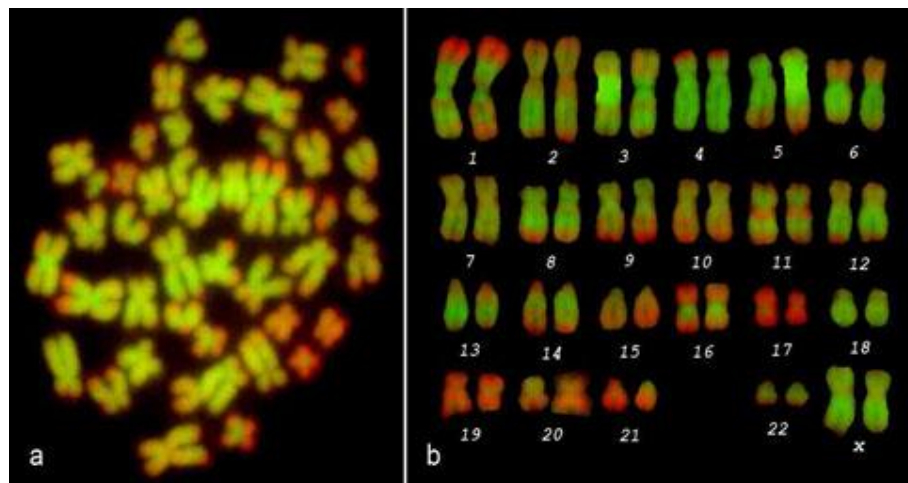
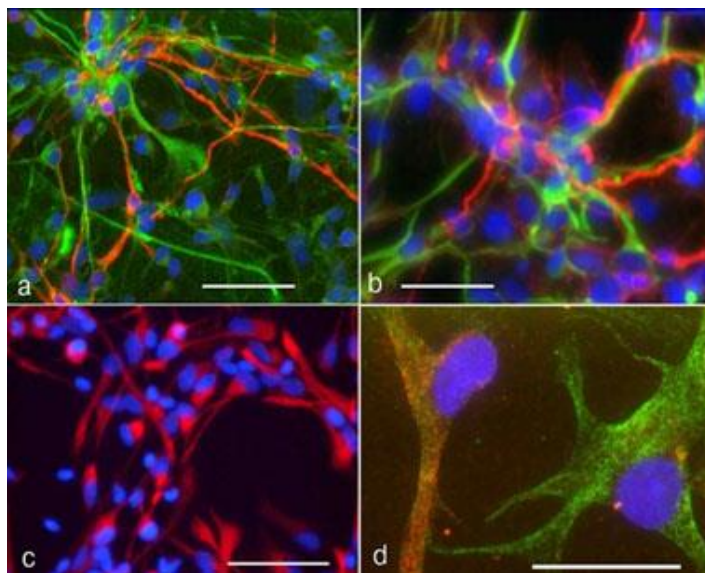
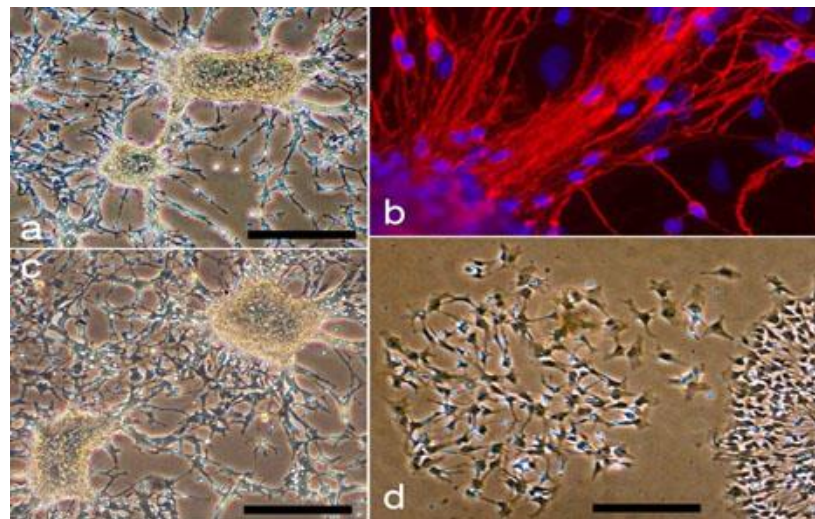
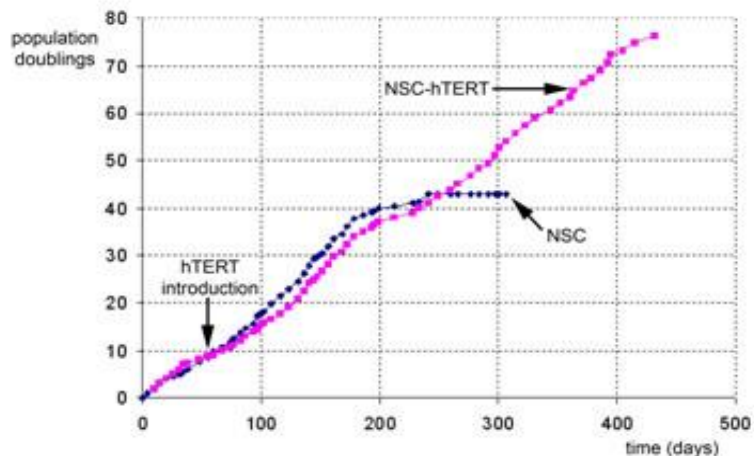
вирусы SV40 и полиомы

Результат активации последовательностей генов (онкогенов), присутствовавших в геноме трансформированной до этого клетки.

# Stable culture of hTERT-transduced human embryonic neural stem cells holds all the features of primary culture

Dashinimaev E.B.<sup>1</sup>, Vishnyakova K.S.<sup>1</sup>, Popov K.V.<sup>1</sup>, Yegorov Y.E.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Science. Russia, Moscow, 119991, Vavilova Street, 32



## Список типов клеток, введенных в культуру

- элементы соединительной ткани человека (фибробласты);
- скелетные ткани (кость и хрящи);
- скелетные, сердечные и гладкие мышцы;
- эпителиальные ткани (печень, легкие, почки и др.);
- клетки нервной системы;
- эндокринные клетки (надпочечники, гипофиз, клетки островков Лангерганса);
- меланоциты и различные опухолевые клетки.

# *Клеточная инженерия* *клеточная и тканевая* *биотехнология*

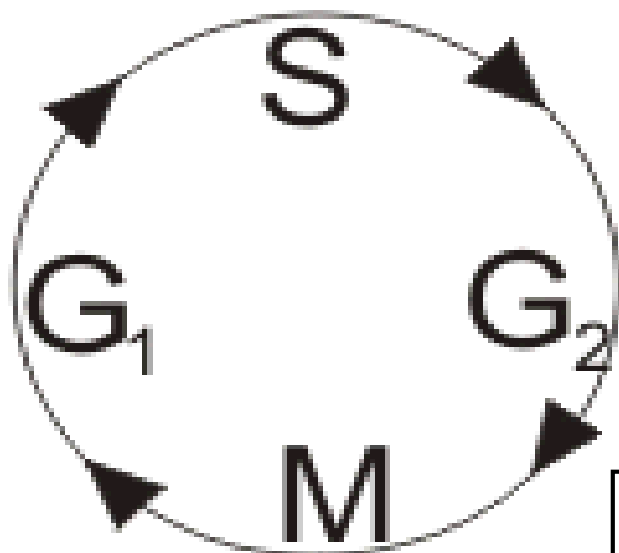
**Клеточная инженерия** — совокупность методов, используемых для конструирования новых клеток. Включает культивирование и клонирование клеток на специально подобранных средах, гибридизацию клеток, пересадку клеточных ядер и другие микрохирургические операции по «разборке» и «сборке» (реконструкции) жизнеспособных клеток из отдельных фрагментов

***Тотипотентность*** – свойство клетки реализовывать генетическую информацию, обеспечивающую её дифференцировку и развитие до целого организма

# Биотехнологии на основе культивируемых клеток и тканей растений



# Индукторы синхронизации



5-аминоурацил

Оксимочевина

Тимидин

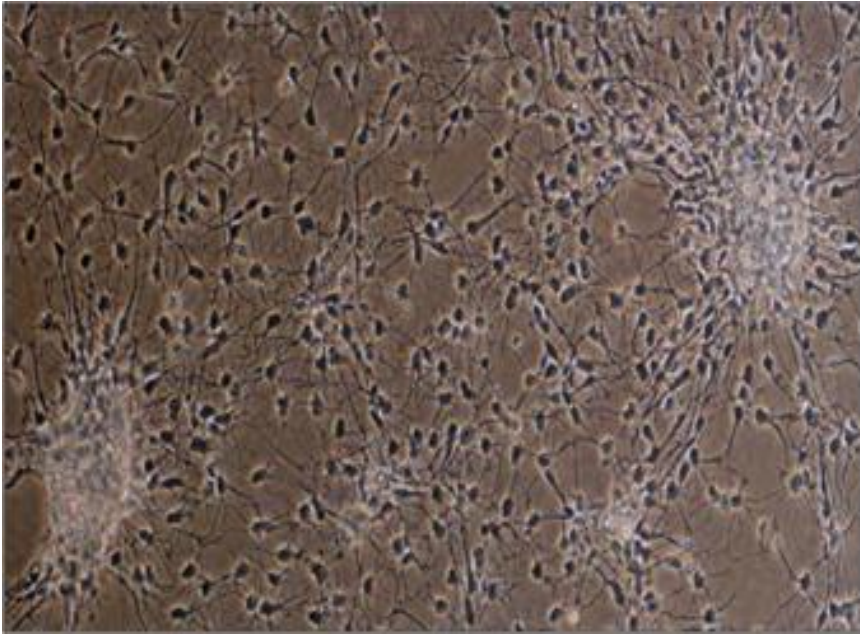
1

Клеточный цикл продолжается до G<sub>1</sub> - периода, клетки накапливаются перед синтетическим периодом. Удаляют ингибитор-синтез и деление.

2

«Голодание» по компоненту культуральной среды. Клетки накапливаются в G<sub>1</sub> или G<sub>2</sub> периоде. Суспензия на среду с недостающим компонентом- синхронизация клеточного деления

## Условия, способствующие размножению клеток



Дифференцировка нервных клеток  
(фото предоставлено д.б.н. Е.Е. Егоровым,  
ИМБ РАН)

*Низкая плотность,  
Невысокая концентрация  $Ca^{2+}$   
100-600 мкМ),  
Присутствие ростовых факторов:  
фактор роста эпидермиса (ФРЭ);  
фактор роста фибробластов (ФРФ);  
и фактор роста, синтезируемый  
тромбоцитами (ФРСТ).*

Высокая плотность клеток (выше  $10^5$   
клеток на  $1\text{ см}^2$ ) и концентрация  $Ca^{2+}$   
(300—1500 мкмоль), присутствие  
индукторов дифференцировки  
(гормоны, например гидрокортизон,  
фактор созревания глии, фактор  
роста нервов, ретиноиды; и  
полярные растворители, в частности  
диметилсульфоксид) способствуют  
прекращению клеточного деления и  
индуцируют **дифференцировку  
клеток**

# Направления в культивировании ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК

**Суспензионные культуры**

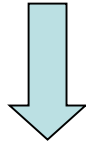
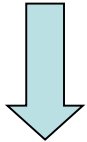


Предпочтительнее с точки зрения увеличения выхода клеток

**Монослойные культуры**



1. Легко провести полную замену среды и промыть клетки перед добавлением свежей среды.



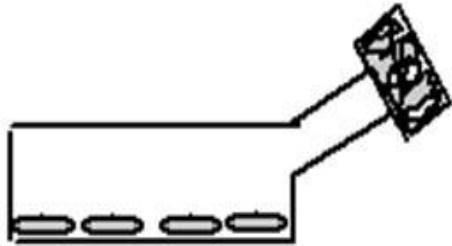
4. Культуры могут быть использованы для любого типа клеток

5. Для распространения вирусов, требуются тесные межклеточные контакты

2. Позволяют обеспечить высокую плотность клеток.

3. У клеток, прикрепленных к субстрату, экспрессия требуемого продукта идет эффективнее

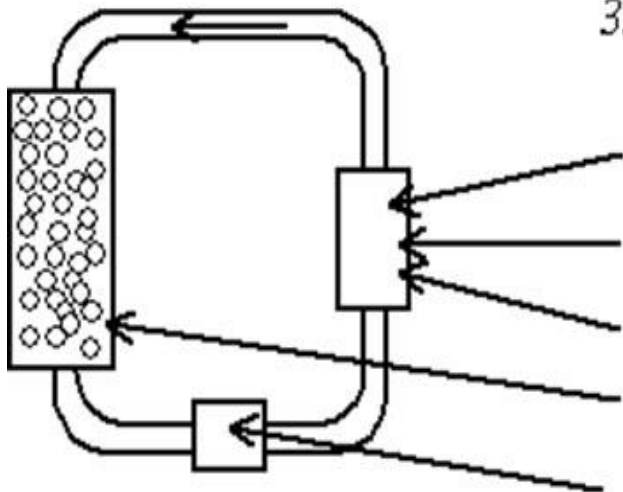
# Системы культивирования клеток ЖИВОТНЫХ



1. Чашка Колле, плоский флакон  
с клетками на дне



2. Вращающаяся бутылка (круглый сосуд)  
с клетками на дне и стенках



3. Колонка с клетками на микроносителях

pH, давление, CO<sub>2</sub>, температура

система контроля и регенерации среды

компоненты питательной среды

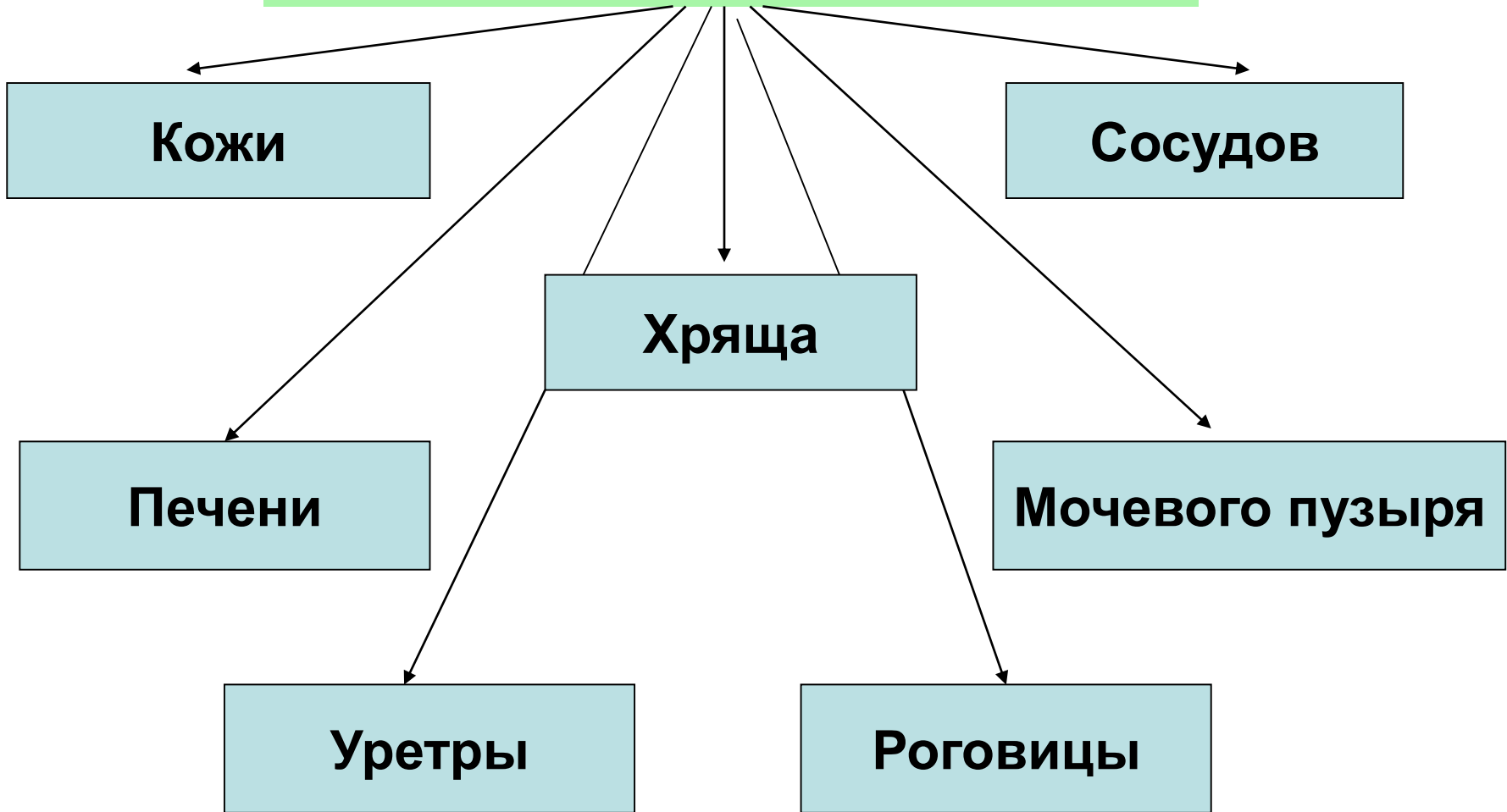
стеклянные бусы

перистальтический насос

## Культивирование органов

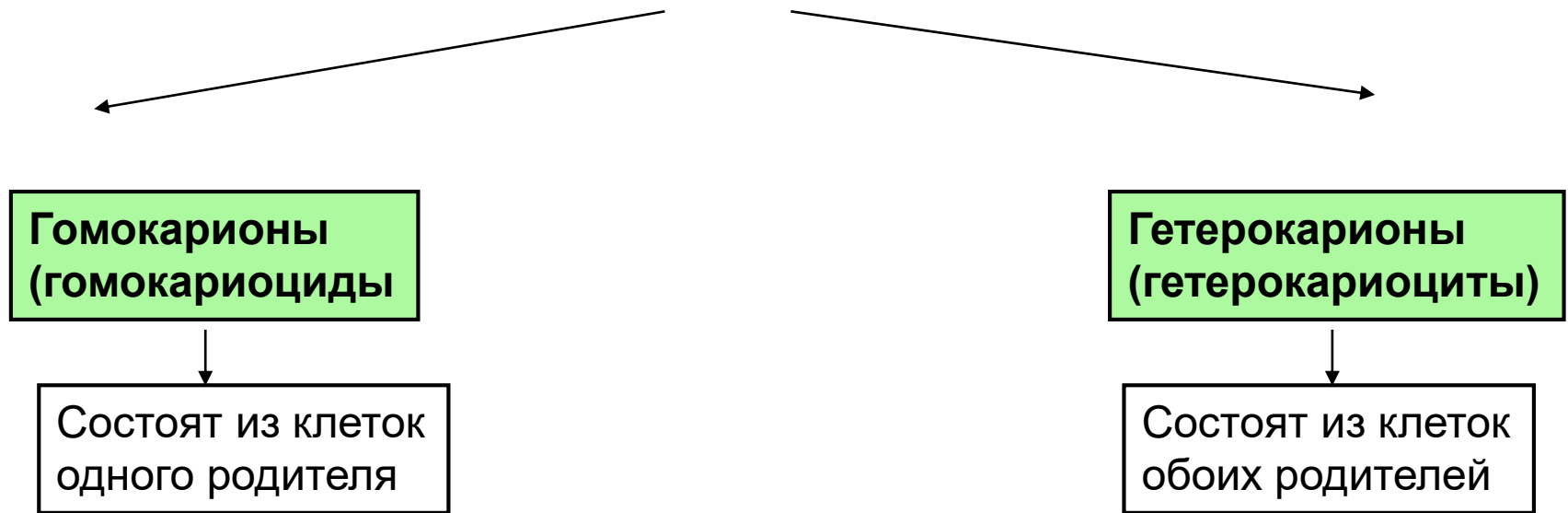
Органная культура - культивирование *in vitro* органа или части органа, в которых сохраняются анатомическая связь и функционирование тканей, максимально приближенные к условиям *in vivo*, т. е. в организме.

# Эквиваленты тканей



# Парасексуальная или соматическая гибридизация растений

**Метод слияния протопластов.** Используются диплоидные клетки растений



Метод позволяет скрещивать представителей разных видов и родов растений и широко используется при выведении новых сортов пшеницы, декоративных, технических, лекарственных растений.

# Гибридизация животных клеток

- Слияние клеток с образованием гетерокарионов, содержащим ядра обоих родительских типов. Образовавшиеся гетерокарионы дают начало двум одноядерным гибридным клеткам.
- В качестве агента, индуцирующего слияние является ***инактивированный вирус HVJ, называемый вирусом Сендай.***

***Агрегационный метод*** (Тарковский, Минц, 1960-1962). Получают химеры не только между двумя эмбрионами, но и между различным числом изолированных бластомеров или отдельными частями эмбрионов.

***Инъекционный метод*** (Гарднер, 1968). Основан на использовании эмбрионов на стадии бластоцисты. Получают межвидовые химеры.

# Методика создания химер

- выделяют яйцеклетки из доноров с различающимися генотипами;
- культивируют эмбрионы на стандартных питательных средах до стадии 8 бластомеров;
- агрегируют морулы (8-кл.) (агрегационный метод) и культивируют *in vitro* до стадии бластоцисты;
- имплантируют химерный эмбрион в матку самки-реципиента

# Клонирование млекопитающих

1986 - слияние безъядерных яйцеклеток с бластомерами, выделенными из 8 и 16-клеточного эмбриона овцы.

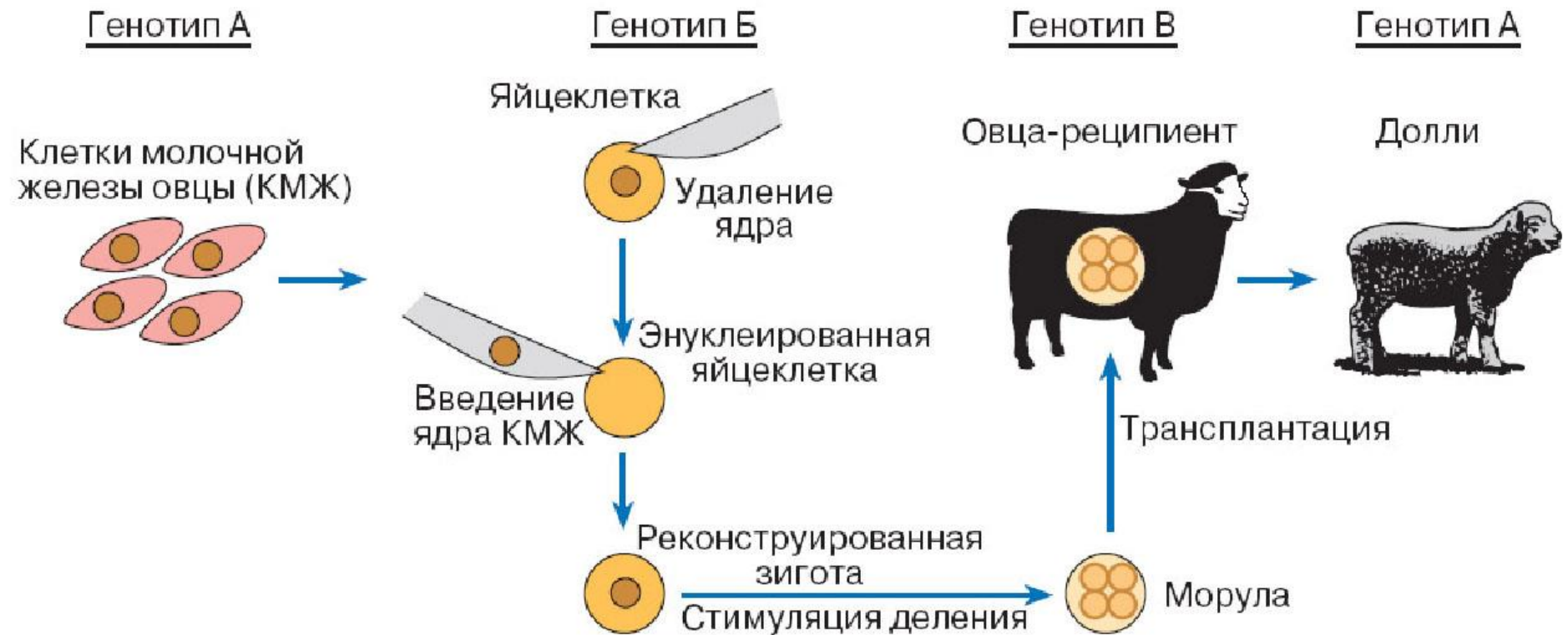
1987 – работы по пересадке ядер крупного рогатого скота (корова)

1988 год - возможность клонирования эмбрионов кроликов.

1989 год- клонирование свиней

1997 год - Институт Рослина (Шотландия). Рождение первого млекопитающего, полученного путем переноса ядра (клонирования).

# ПРИНЦИП ПОЛУЧЕНИЯ КЛОНА МЛЕКОПИТАЮЩИХ



# Новые направления клеточной биологии

## Клеточная трансплантология

Введение клеток в больной организм для его лечения. Проводиться для замещения нефункционирующей или дефектной ткани или клеточной популяции.

## Тканевая инженерия

Трансплантация культивированных клеток на биосовместимом носителе с целью восстановления поврежденной ткани, органа или создания их *de novo*.

Клетки, используемые в клеточных технологиях

```
graph TD; A[Клетки, используемые в клеточных технологиях] --> B[Собственные (аутогенные)]; A --> C[Донорские (аллогенные)]; A --> D[Животные клетки с подавленным иммунитетом (ксеногенные)];
```

Собственные  
(аутогенные)

Донорские  
(аллогенные)

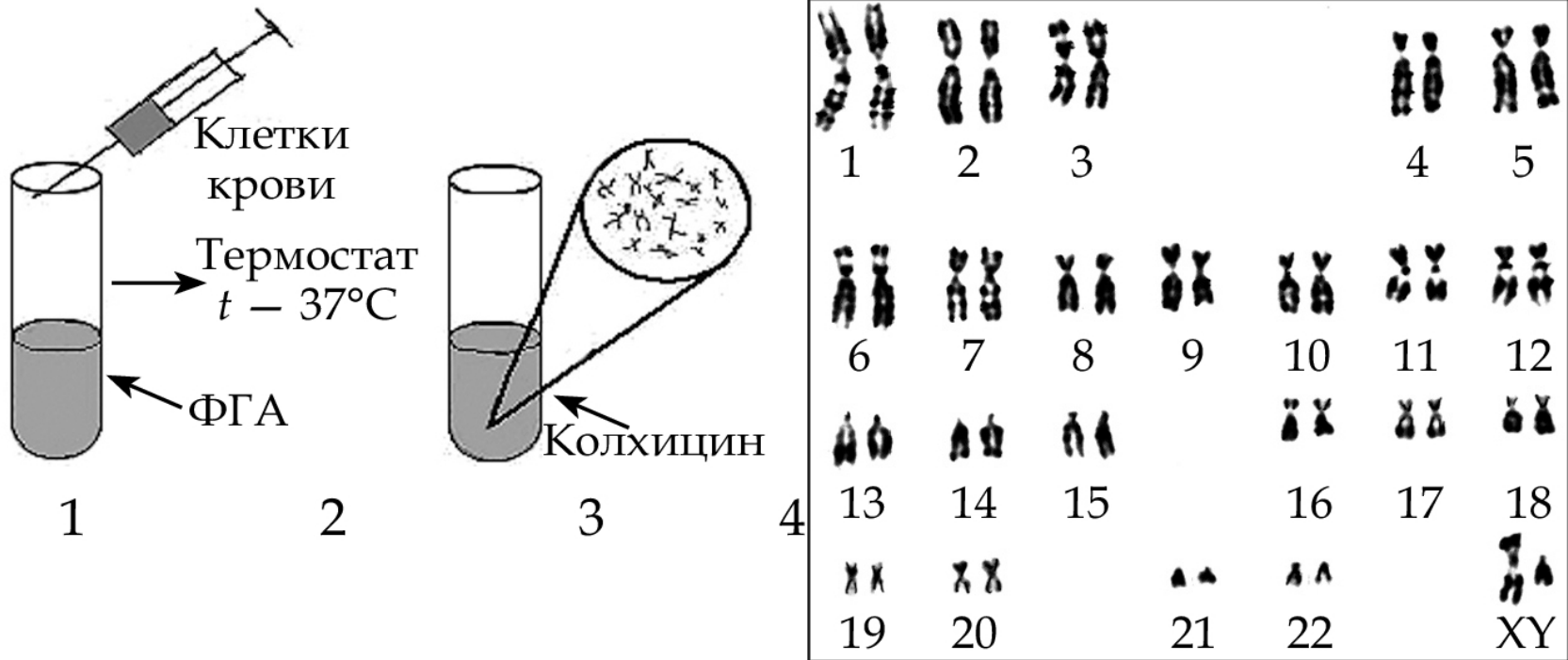
Животные клетки с  
подавленным  
иммунитетом  
(ксеногенные)

# Экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО)

## Основные этапы лечения методом ЭКО:

- стимуляция суперовуляции (созревания нескольких яйцеклеток в одном менструальном цикле женщины);
- получение яйцеклеток путем пункции яичников;
- оплодотворение яйцеклеток «в пробирке»;
- культивирование эмбрионов от 2 до 6 дней в искусственных условиях;
- перенос эмбрионов в полость матки.

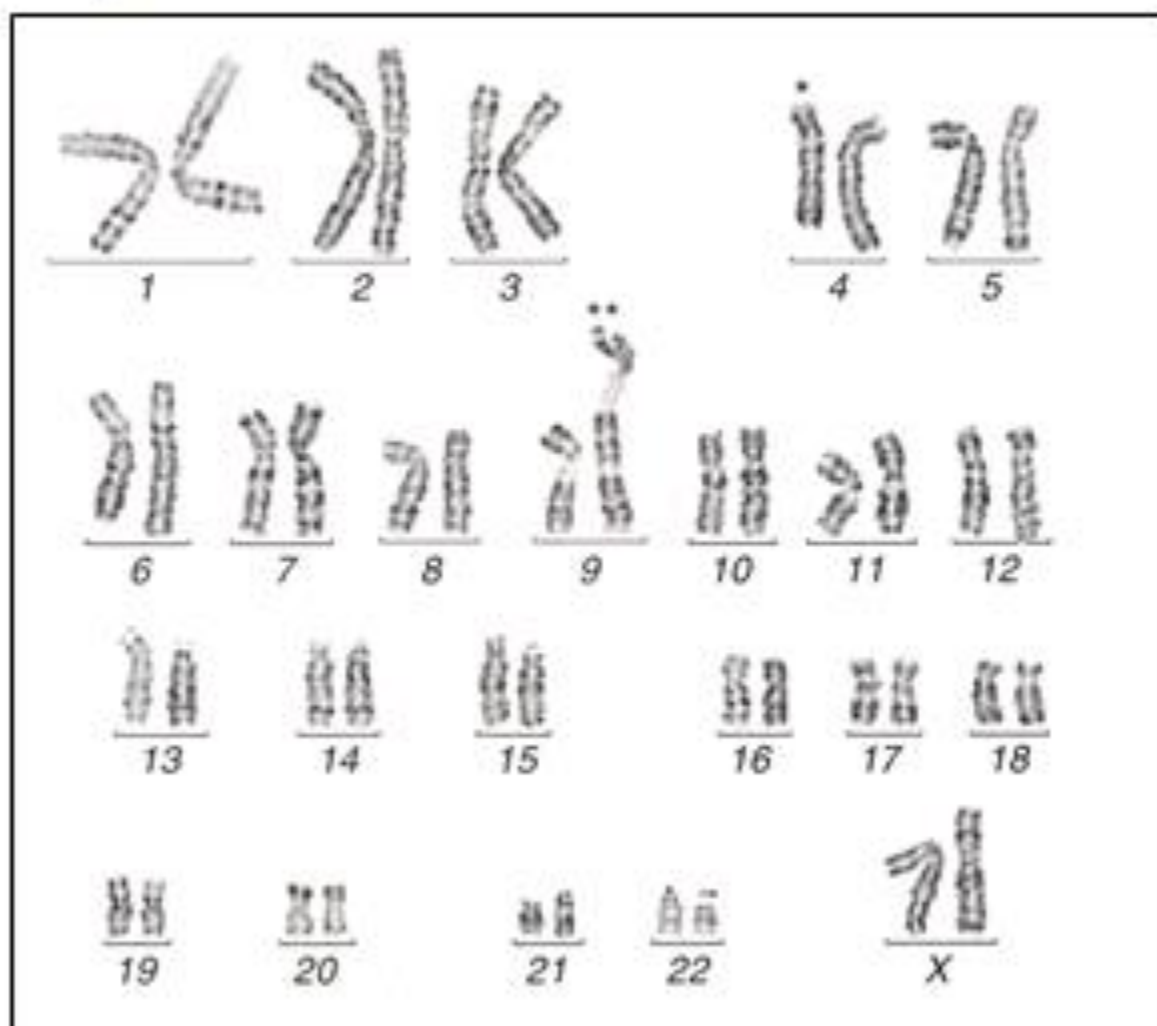
# Цитогенетический метод изучения наследственности человека



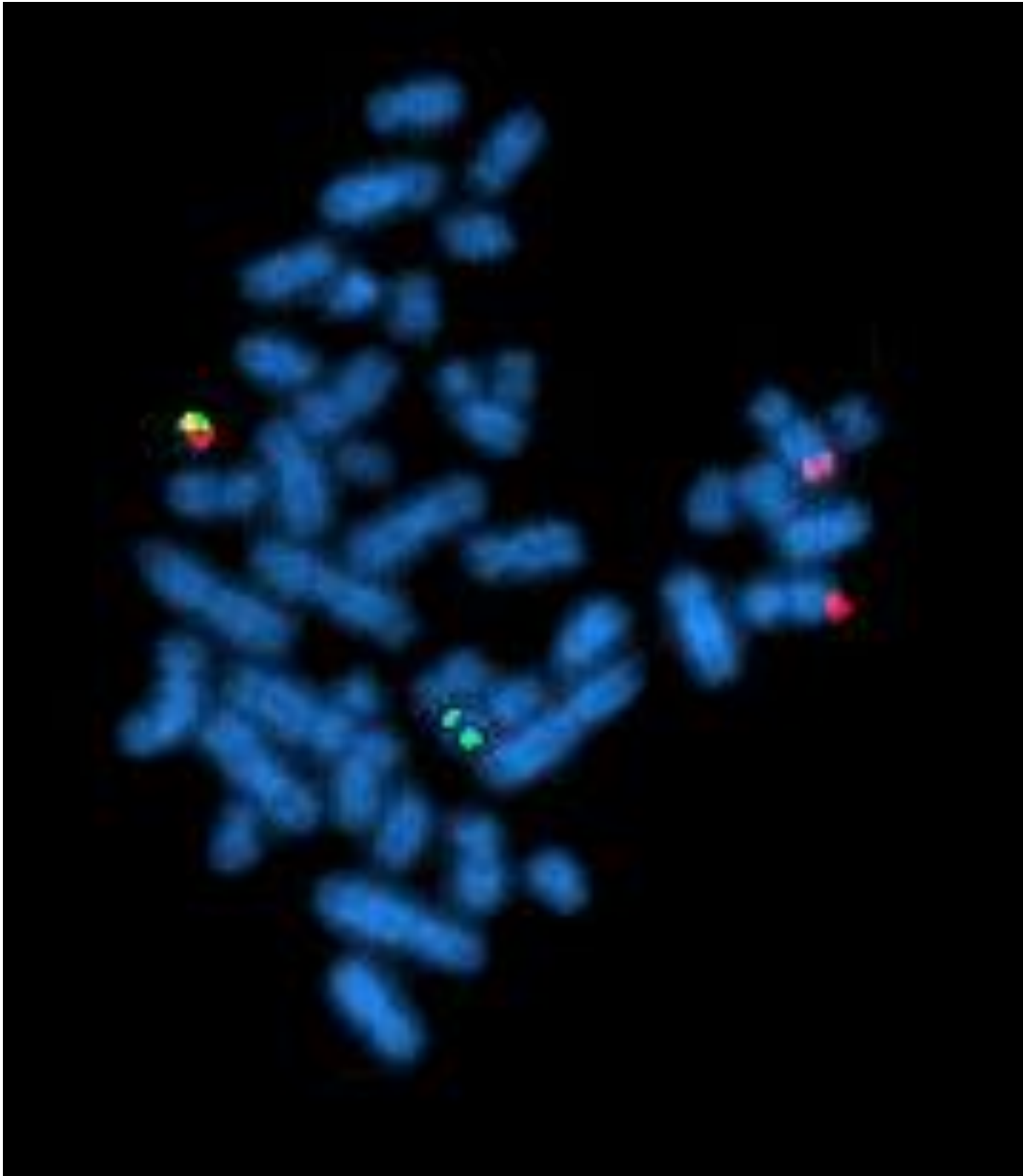
Последовательность действий для получения кариотипа человека:

1. Помещение лимфоцитов (лейкоцитов) в среду с фитогемагглютинином (ФГА).
2. Культивирование клеток (митотические деления клеток).
3. Остановка митоза на стадии метафазы путем введения в среду колхицина.
4. Обработка гипотоническим раствором, изготовление микропрепаратов, получение микрофотографий метафазных пластинок (кариотипов).
5. Составление индивидуального хромосомного комплекса (кариограммы)

## Хромосомные перестройки и стабильность кариотипа культуры эмбриональных стволовых клеток человека hESM

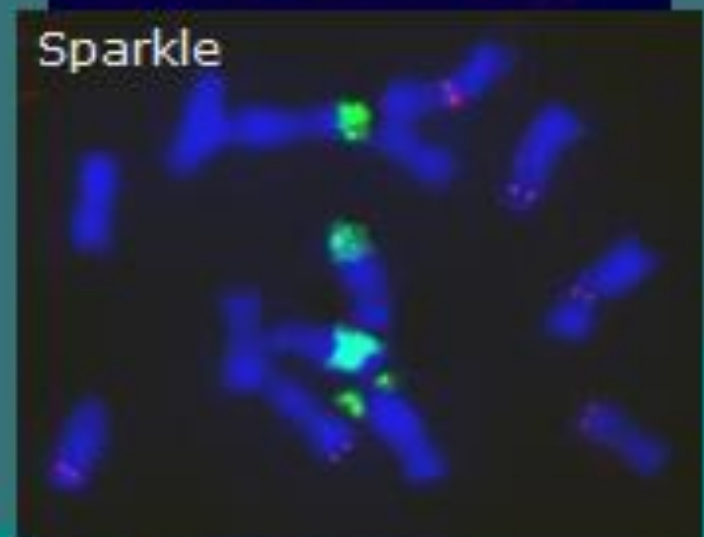
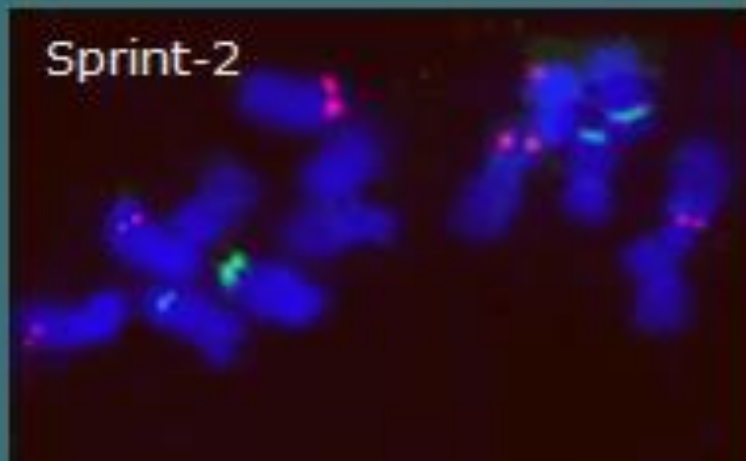
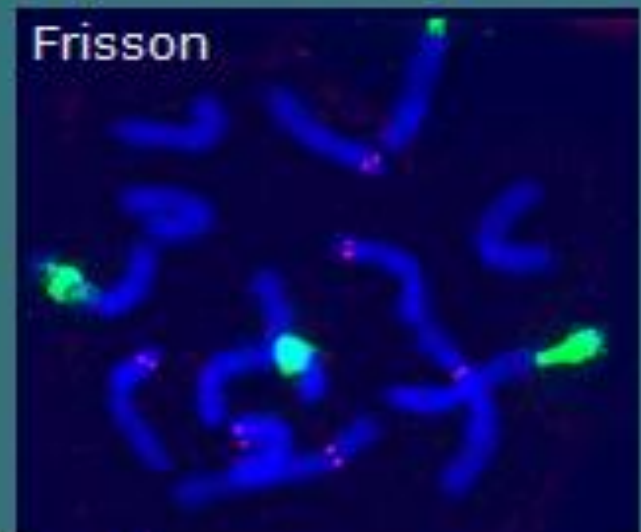
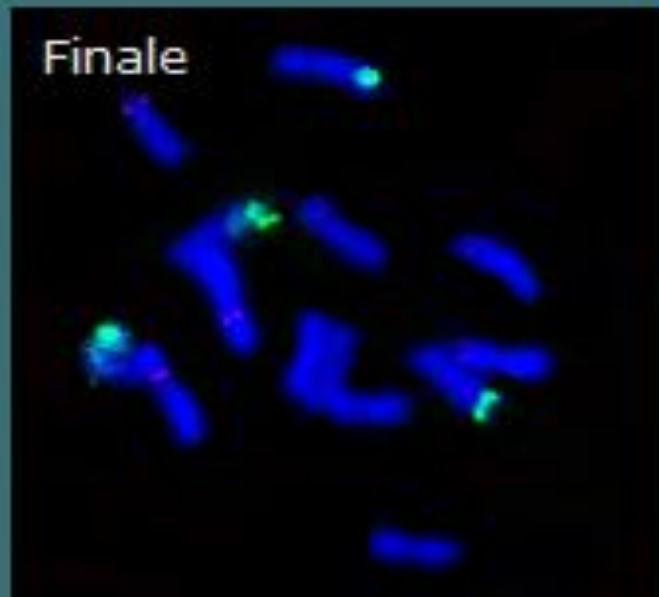


Дифференциально окрашенные хромосомы клетки линии hESMO3der9 (46,XXdel(4), der(9)). Окраска красителем DAPI

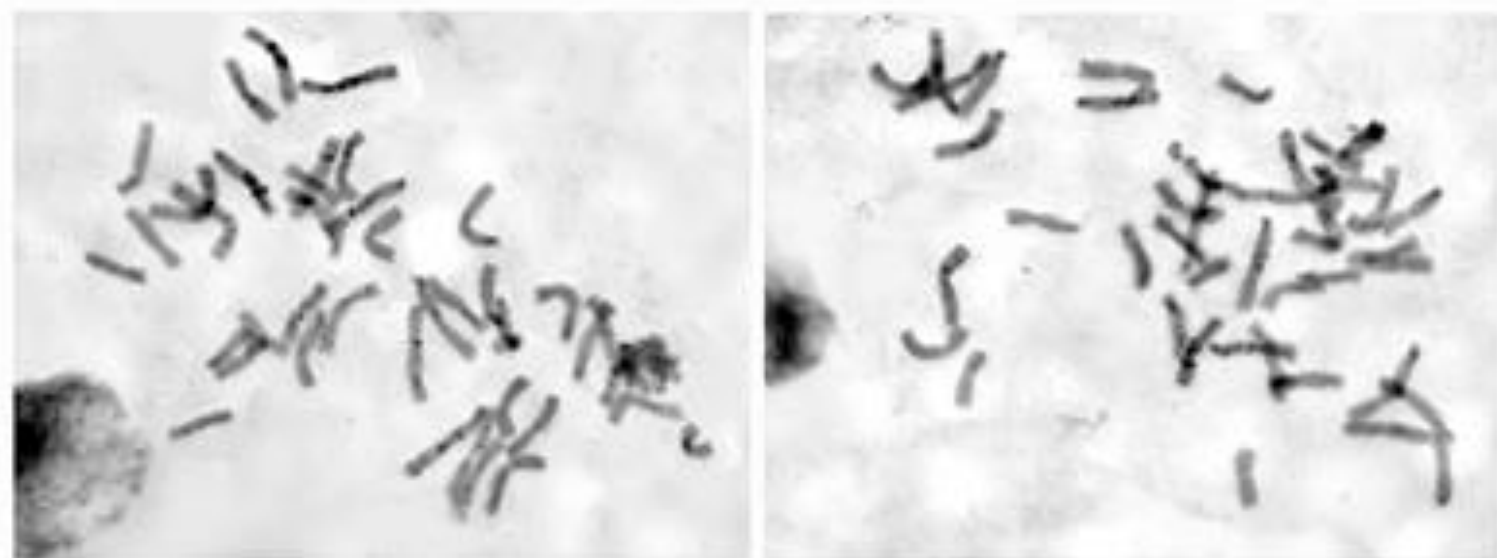


Флуоресцентная  
гибридизация  
*in situ* метафазных хромосом  
(5S и 26S рДНК).

Локализация 18-26S рДНК (красный) и 5S рДНК (зеленый) на хромосомах различных сортов и линий гороха



## C-дифференциально окрашенные хромосомы



а



кариотипы  
карликовой пшеницы (а)  
и гороха посевного (б)  
К и на борту МКС

# Использование культуры клеток человека

Используют для изучения патогенеза и диагностики наследственных болезней

Составляют строму многих органов, являются важными участниками их морфогенеза и создают условия микроокружения, необходимого для дифференцировки и функционирования специализированных клеток.

Содержат фермент моноаминоксидаза, изменения активности которого характерны для некоторых нервных и психических заболеваний.

Содержат рецепторы к глюкокортикоидным гормонам, инсулину, некоторым нейромедиаторам

# Классификация СК по источнику происхождения или получения

Стволовые клетки

```
graph TD; A[Стволовые клетки] --> B[Эмбриональные]; A --> C[Тканей взрослого организма];
```

Эмбриональные

Тканей взрослого организма

# КЛАССИФИКАЦИЯ СК ПО СПОСОБНОСТИ ДИФФЕРЕНЦИРОВАТЬСЯ

**ТОТИПОТЕНТНЫЕ-**  
способны образовывать  
клетки любых типов

**ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ-**  
способны образовывать  
клетки многих, но не всех типов

**МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ-**  
способны образовывать  
клетки нескольких типов

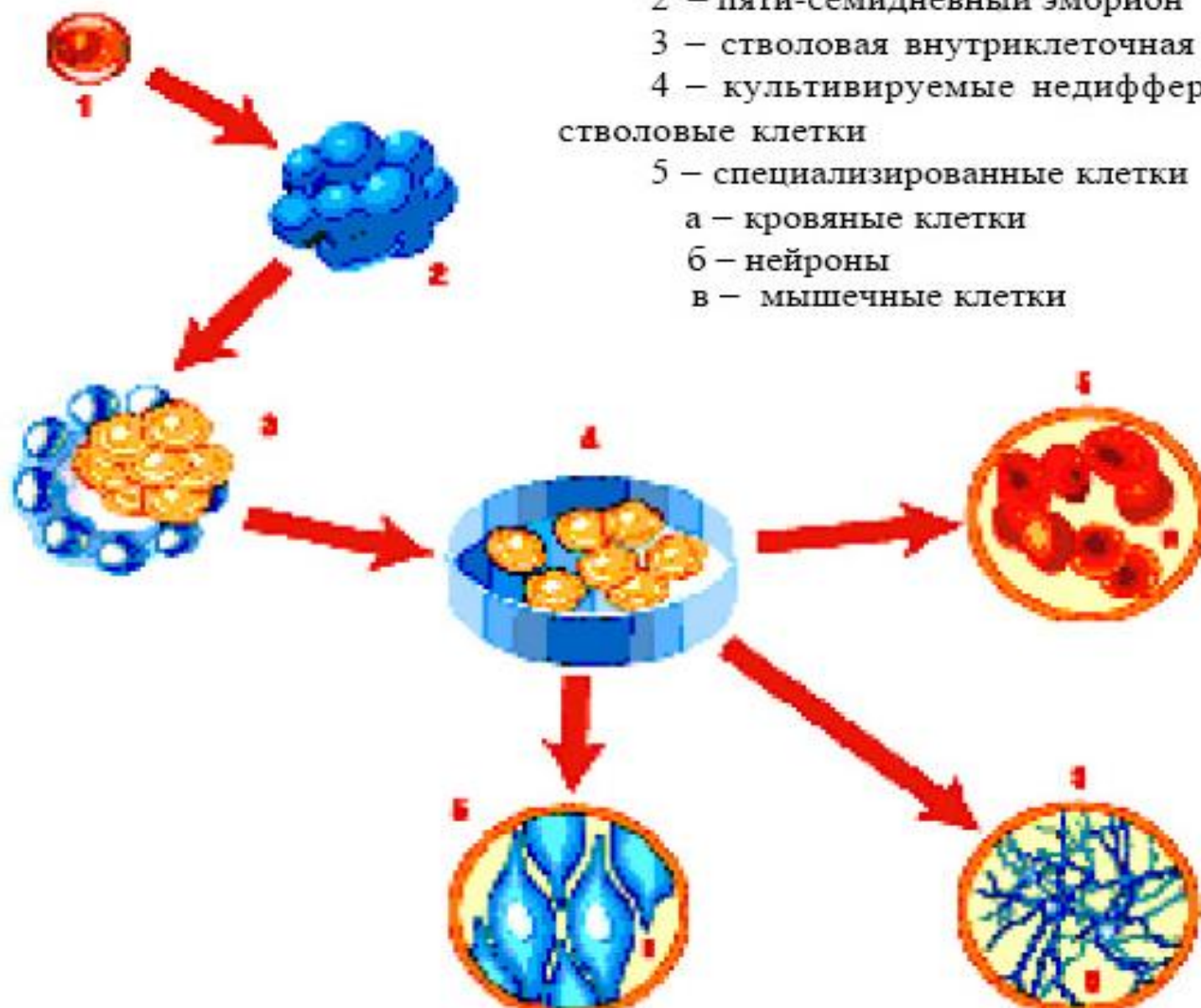
**УНИПОТЕНТНЫЕ-**  
от которых дифференцируется  
только один тип клеток

## Свойства СК

- не специализированы;
- способны к пролиферации;
- способны к дифференцировке;
- способны к ассиметричному делению;
- способствуют к регенерации.

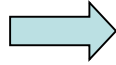
# Выращивание стволовых клеток

- 1 – искусственно оплодотворенная яйцеклетка
- 2 – пяти-семидневный эмбрион
- 3 – стволовая внутриклеточная масса
- 4 – культивируемые недифференцированные стволовые клетки
- 5 – специализированные клетки
  - а – кровяные клетки
  - б – нейроны
  - в – мышечные клетки



# СК взрослого организма

**Гемопозитические  
стволовые  
клетки (ГСК)**



Мультипотентная СК взрослого организма, способная к дифференцировке во все клетки крови. Кроме костного мозга ГКС обнаружены в системном кровотоке и скелетных мышцах.

**Мезенхимные  
стволовые  
клетки (МСК)**



Мультипотентные региональные стволовые клетки, содержащиеся во всех мезенхимальных тканях (главным образом в костном мозге), способные к дифференцировке в различные типы мезенхимальных тканей, а так же в клетки других зародышевых слоёв

**Стромальные  
стволовые  
клетки (ССК)**



Мультипотентные стволовые клетки взрослого организма, образующие строму костного мозга (поддерживающую гемопоэз), имеющие мезенхимальное происхождение.

**Тканеспецифические  
стволовые  
клетки (ТСК)**



Располагаются в различных видах тканей и в первую очередь, отвечают за обновление их клеточной популяции, первыми активируются при повреждении. Обладают более низким потенциалом, чем стромальные клетки костного мозга.

НЕРВНАЯ ТКАНЬ

КОЖА

СКЕЛЕТНАЯ МУСКУЛАТУРА

КЛЕТКИ МИОКАРДА

ЖИРОВАЯ ТКАНЬ

СПИННОЙ МОЗГ

ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫЙ ТРАКТ

# **В КАЧЕСТВЕ ИСТОЧНИКОВ ВСК В МЕДИЦИНЕ ИСПОЛЬЗУЮТ**

**КОСТНЫЙ МОЗГ**

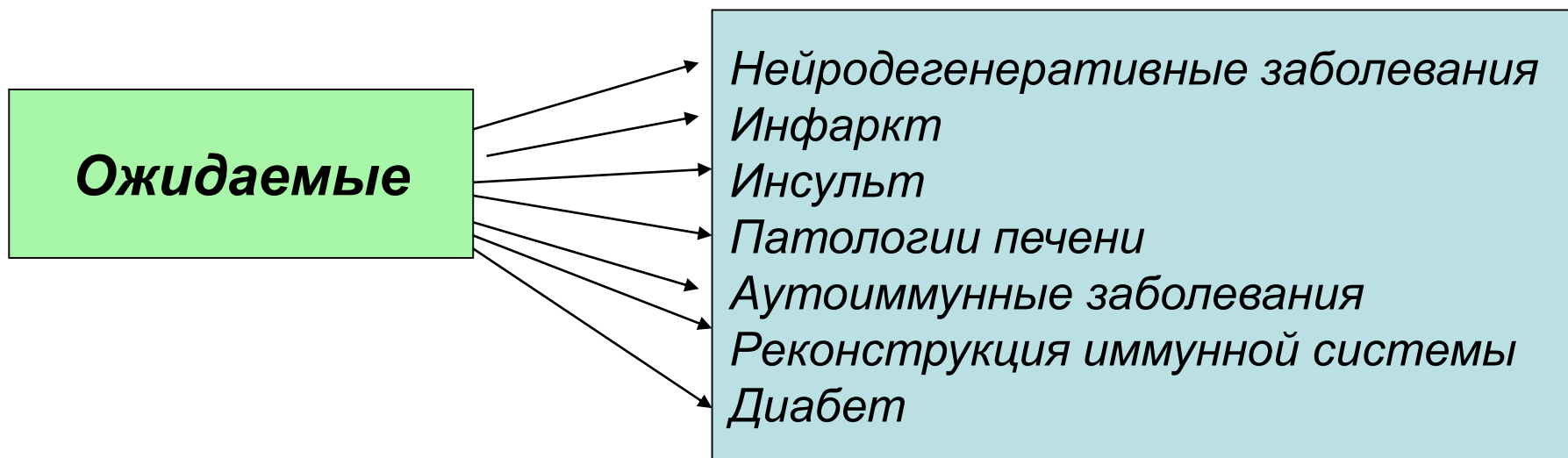
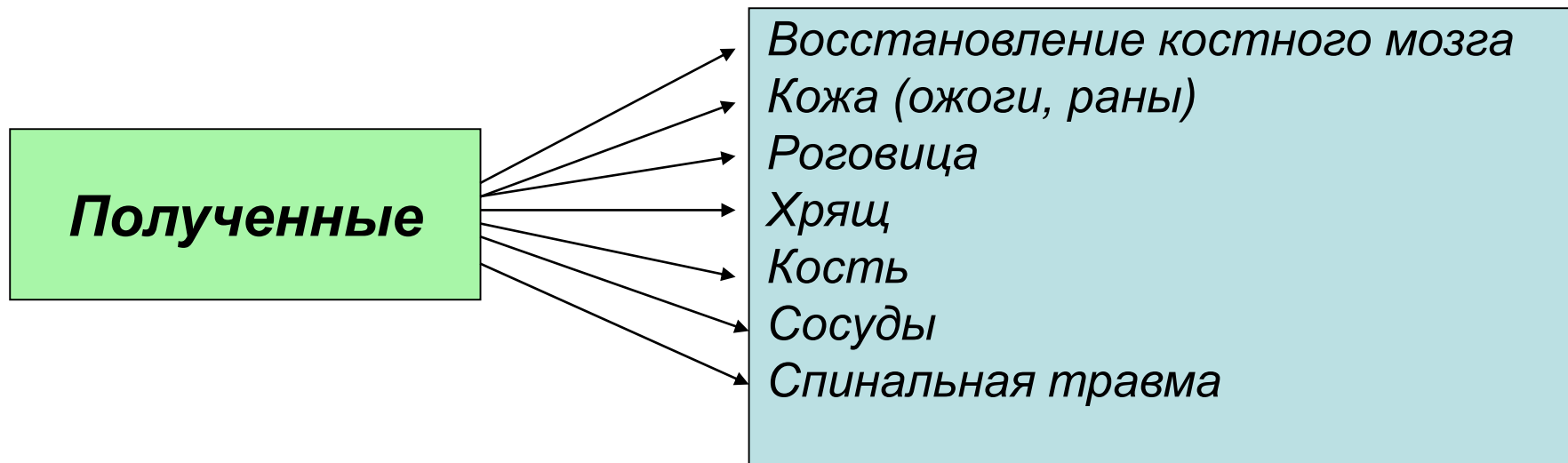
**СЛИЗУСТАЯ ОБОЛОЧКА  
НОСОГЛОТКИ В РАЙОНЕ  
ОБОНЯТЕЛЬНЫХ РЕЦЕПТОРОВ**

**ЖИРОВАЯ ТКАНЬ**

**ПЛАЦЕНТАРНАЯ И  
ПУПОВИННАЯ КРОВЬ  
НОВОРОЖДЕННЫХ**

**ПЛАЦЕНТА**

# **Результаты использования клеточных технологий**



## СОЗДАНИЕ БАНКОВ СК

Страна	Название банка	Адрес	Сайт
Россия	Гемабанк - Банк Стволовых Клеток, (Институт Стволовых Клеток Человека), На базе РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН	Москва, Каширское шоссе, дом 23/5	<a href="http://www.gemabank.ru">www.gemabank.ru</a>
	Гемабанк Санкт-Петербург («Крионикс»)	Санкт-Петербург, Кронверкский пр. д.71\46,	<a href="http://www.gemabank.ru/spb">www.gemabank.ru/spb</a>
	Банк Стволовых Клеток Флора-Мед	Москва, Хорошевское шоссе, 76-а	<a href="http://www.floramed.ru">www.floramed.ru</a>
	Криоцентр	Москва, ул. Академика Опарина, 4	<a href="http://www.cryocenter.ru">www.cryocenter.ru</a>
	Транс-Технологии	Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 70/4, кв.6	
Украина	Семейный банк ПК «ГЕМАФОНД»	Киев, ул. Соломенская, 2	<a href="http://www.hemafund.com">www.hemafund.com</a>

# КЛЕТОЧНАЯ ТРАНСПЛАНТОЛОГИЯ

Инъекция ВСК мыши  
в миокард поврежденного  
ЛЖ мыши



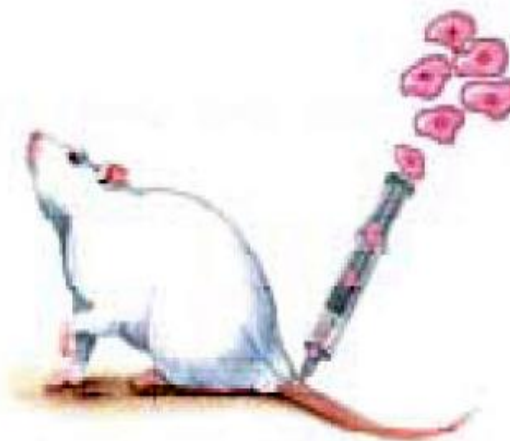
ВСК

СК помогают  
регенерировать  
поврежденный  
миокард

Поврежденные  
клетки миокарда



Инъекция ВСК человека  
в сосуды мыши



СК вызывают ангиогенез и пролиферацию существующей  
сосудистой сети поврежденного миокарда

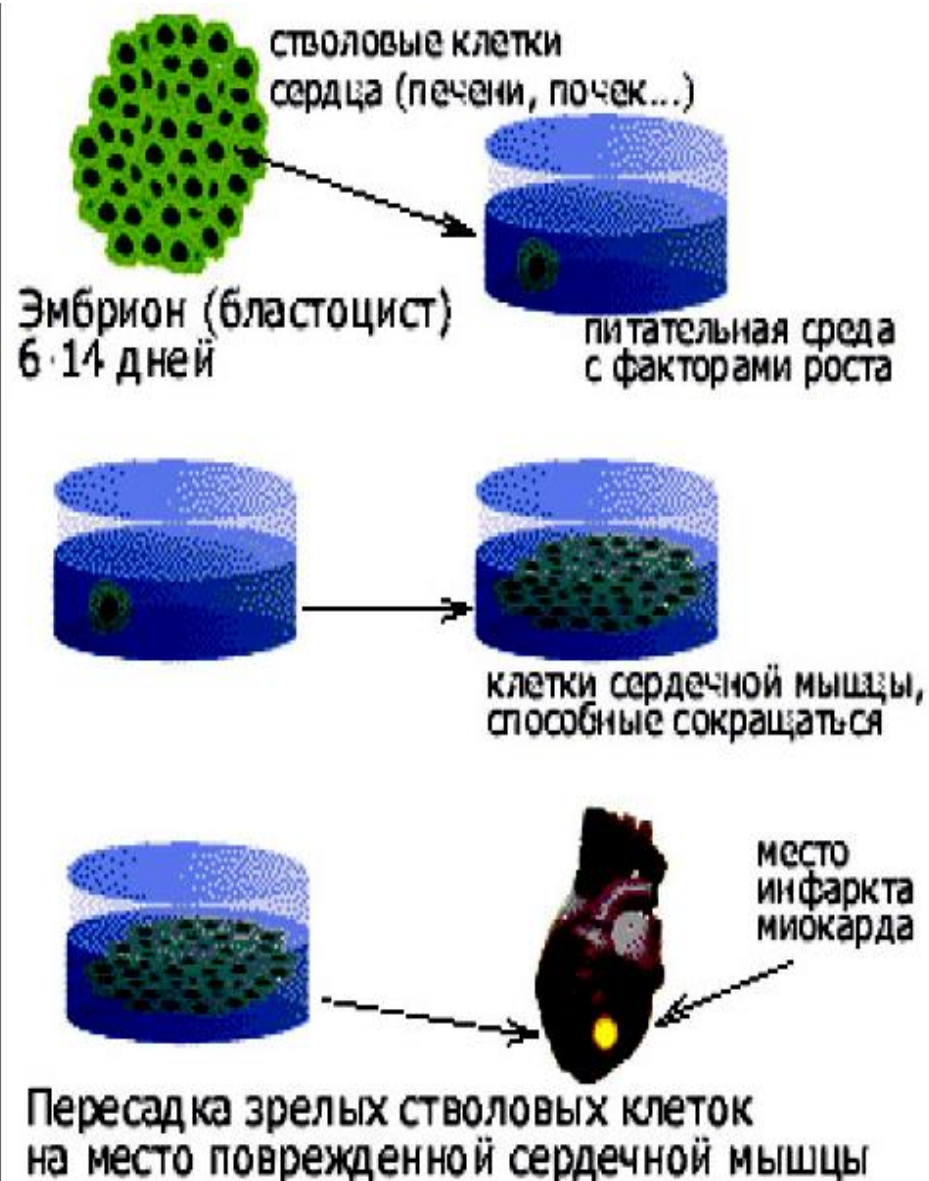
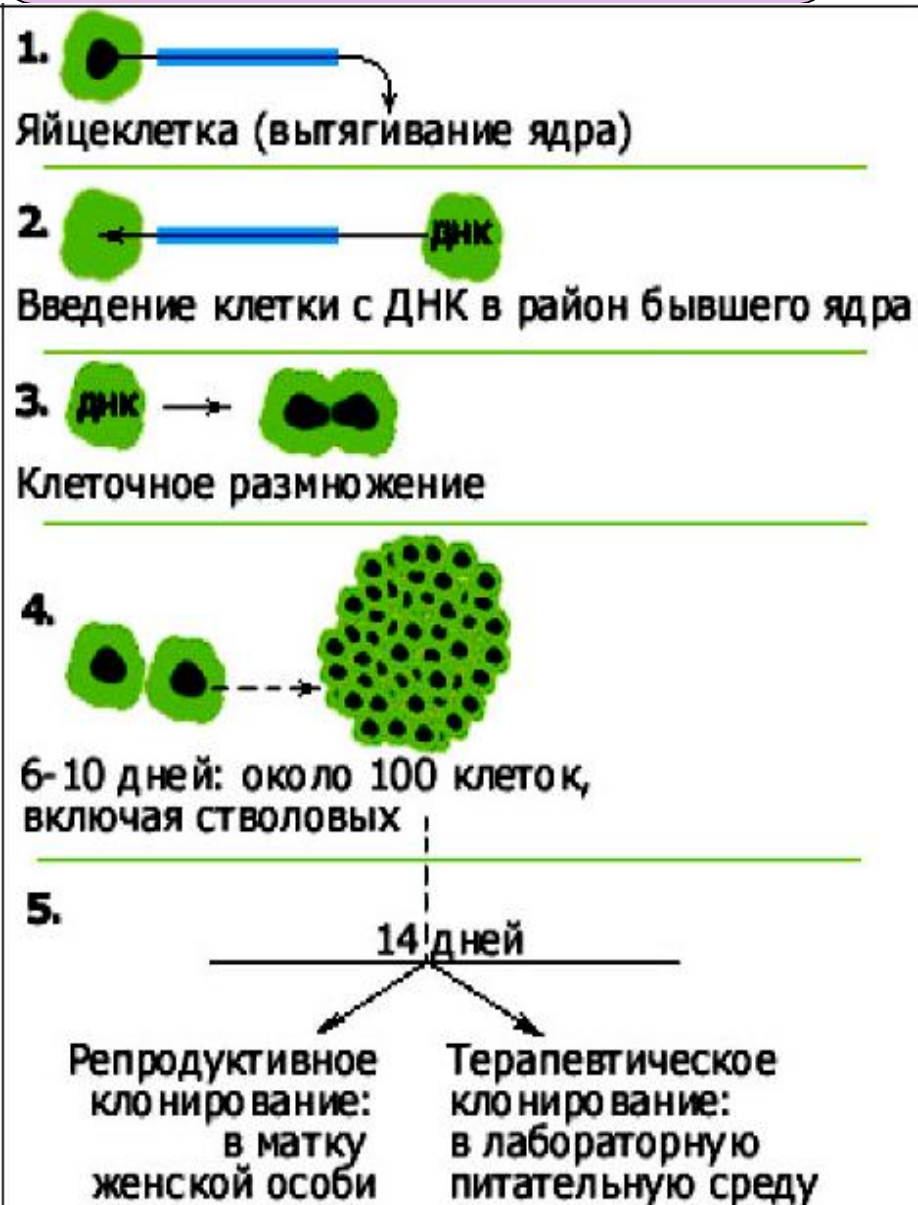
Новые  
сосуды

ВСК

Поврежденные  
клетки миокарда



# ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ КЛОНИРОВАНИЕ



# КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ СК

ЛЕЧЕНИЕ ОЖОГОВ,  
ЗАЖИВЛЕНИЕ РАН

ЛЕЧЕНИЕ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ  
БОЛЬНЫХ

НЕВРОЛОГИЯ

КАРДИОЛОГИЯ

ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

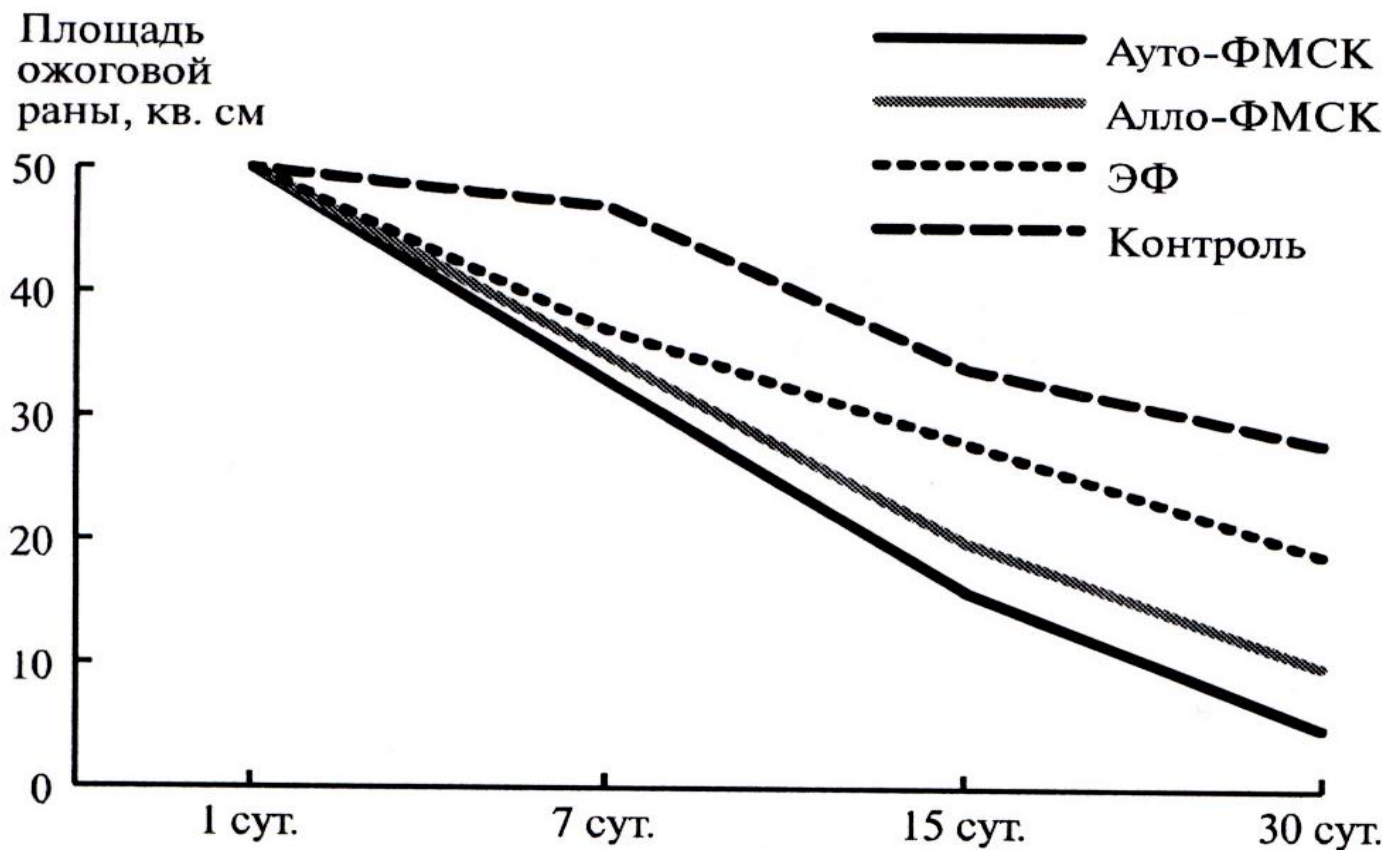
ГЕПАТОЛОГИЯ

КОСМЕТОЛОГИЯ

БОЛЕЗНИ ОПОРНО-  
ДВИГАТЕЛЬНОГО  
АППАРАТА

ГЕРАНТОЛОГИЯ

# ЛЕЧЕНИЕ ОЖОГОВ, ЗАЖИВЛЕНИЕ РАН



**Динамика уменьшения площади ожоговой раны в зависимости от вида трансплантируемых клеток**

# ЛЕЧЕНИЕ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Трансплантация клеток  
пуповинной крови

```
graph TD; A[Трансплантация клеток пуповинной крови] --> B[лейкозы]; A --> C[нейробластома]; A --> D[неходжкинская лимфома]; A --> E[миелодиспластический синдром];
```

лейкозы

нейробластома

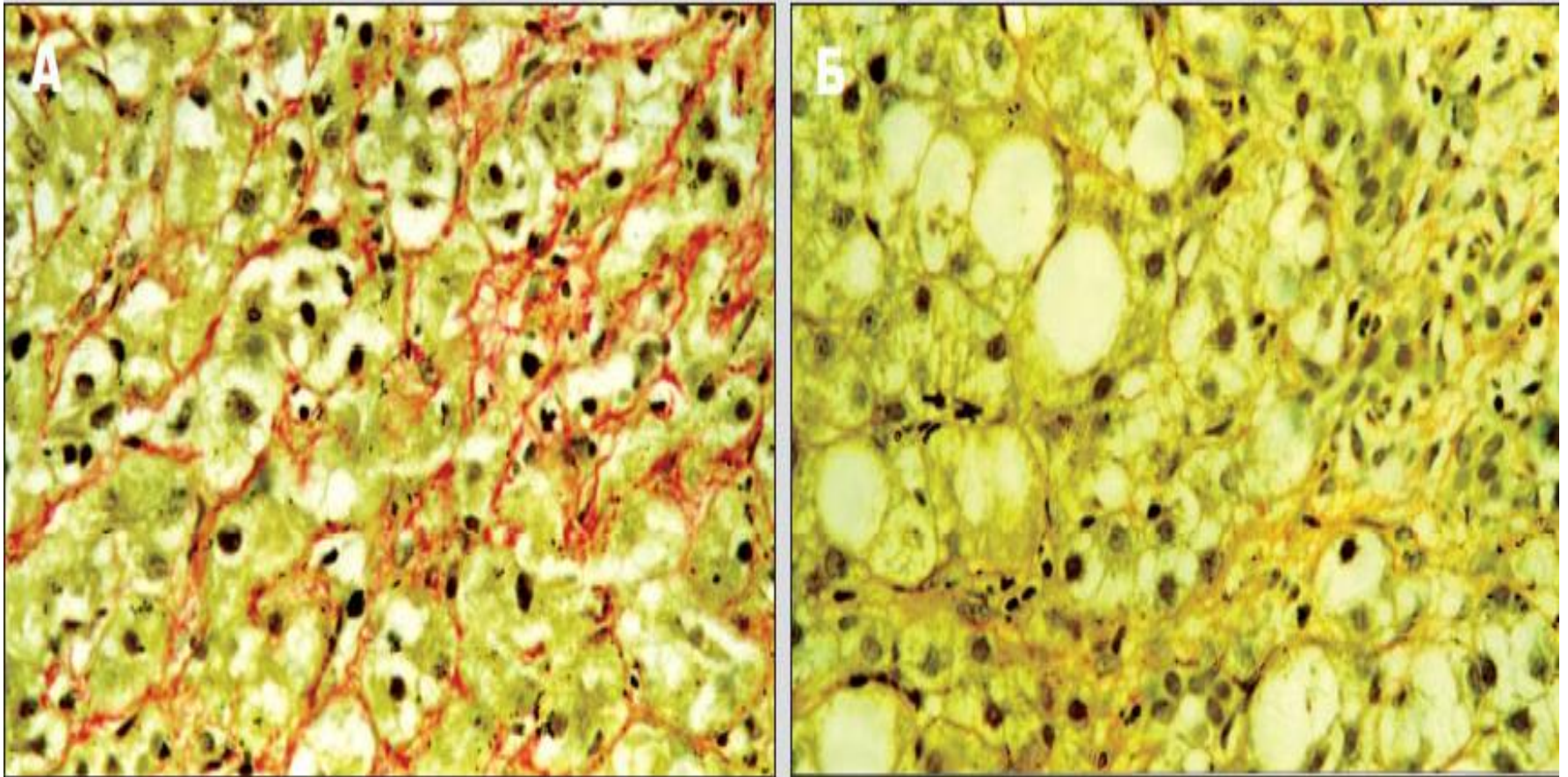
неходжкинская лимфома

миелодиспластический  
синдром

# НЕВРОЛОГИЯ

Заболевание	Кол-во пациентов	Кол-во трансплантаций	Клинический эффект	
			хороший или удовлетворительный	сомнительный или отсутствует
Детский церебральный паралич	130	320	98 (75%)	32 (25%)
Острая черепно-мозговая травма (кома)	52	93	46 (88%)	6 (12%)
Последствия черепно-мозговой травмы	80	154	70 (90%)	10 (5%)
Последствия мозгового инсульта	17	23	13 (76%)	5 (24%)
Последствия нейроинфекции (клещевой энцефалит, менингоэнцефалит)	11	22	9 (82%)	2 (18%)
Последствия спинальной травмы	132	355	84 (63%)	48 (37%)
Постгипоксическая энцефалопатия	13	37	2 (15%)	11 (85%)
Дегенеративные заболевания (болезнь Паркинсона, рассеянный склероз)	17	18	1 (6%)	16 (94%)
<b>Всего</b>	<b>452</b>	<b>1022</b>		

## Трансплантация аутогенных гемопоэтических СК больным хроническими гепатитами



Перисиносоидальный фиброз а) до трансплантации; б) через месяц после трансплантации. Окраска по Ван-Гизону, х400

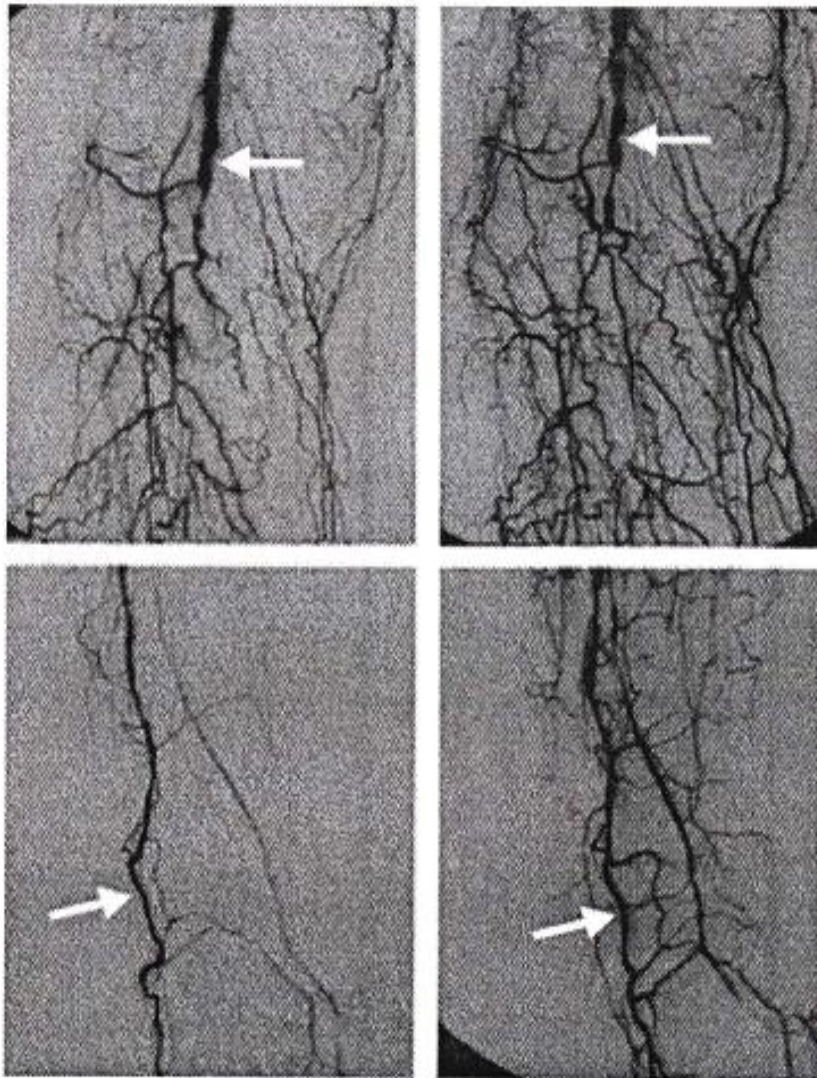
# ТЕРАПИЯ ОСТРОГО ИНФАРКТА МИОКАРДА

## СТРАТЕГИИ КЛЕТЧНОЙ ТЕРАПИИ ИНФАРКТА МИОКАРДА

**ХИРУРГИЧЕСКАЯ  
НЕПОСРЕДСТВЕННАЯ ДОСТАВКА СК  
К ТКАНИ МИОКАРДА**

**ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ  
СОЗДАНИЕ В КРОВИ ВЫСОКОЙ  
КОНЦЕНТРАЦИИ СК В РЕЗУЛЬТАТЕ  
СТИМУЛЯЦИИ КОСТНОГО МОЗГА**

## ИШЕМИИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ



До  
имплантации

24 недели  
после

Ангиограммы больного с повреждением дистальных сосудов нижних конечностей до и после (через 24 недели) имплантации моноклеарных клеток, выделенных из костного мозга.

Введение моноклеарных клеток стимулирует ангиогенез в тканях нижних конечностей.

# ПРИМЕНЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В ТРАВМАТОЛОГИИ И ОРТОПЕДИИ

```
graph TD; A[ПРИМЕНЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В ТРАВМАТОЛОГИИ И ОРТОПЕДИИ] --> B[Лечение не срастающихся переломов]; A --> C[Регенерация костных тканей при свежих переломах]; A --> D[Восстановление дефектов кости]; A --> E[Лечение повреждений крупных сухожилий];
```

*Лечение  
не срастающихся  
переломов*

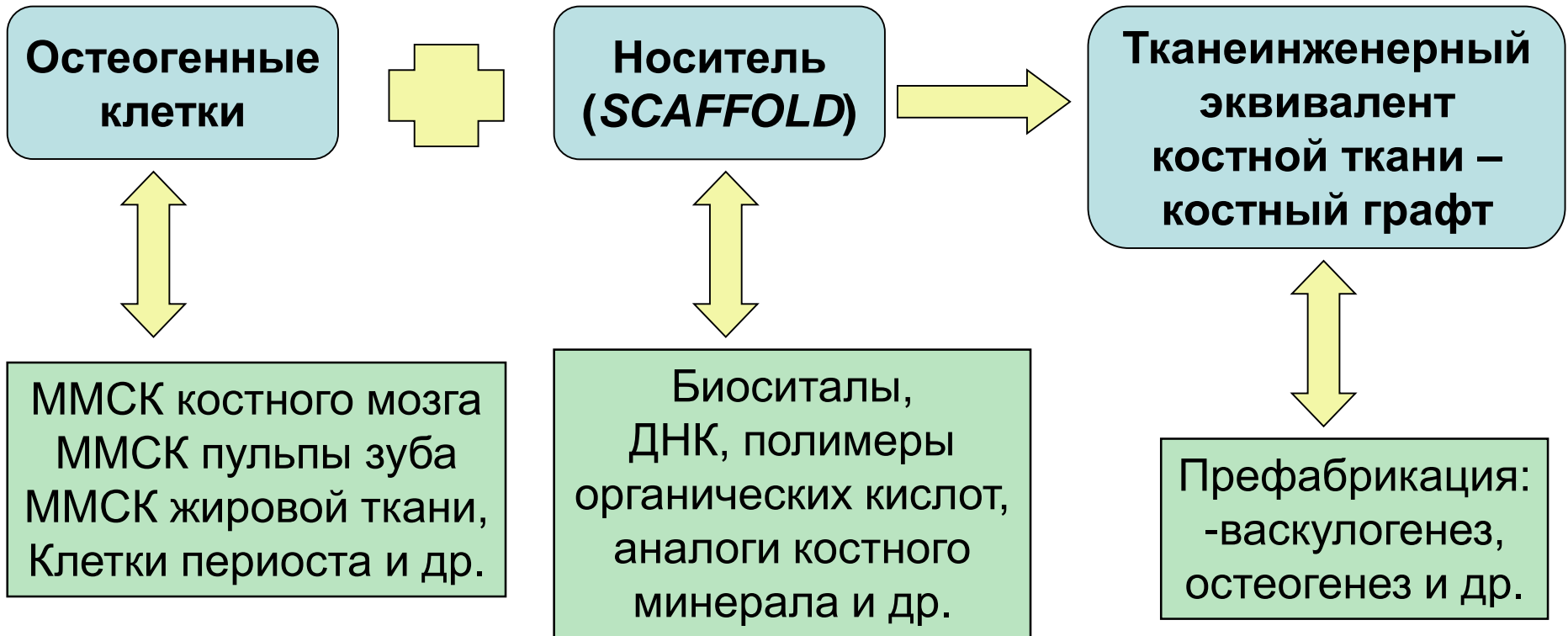
*Регенерация костных  
тканей при свежих переломах*

*Восстановление  
дефектов кости*

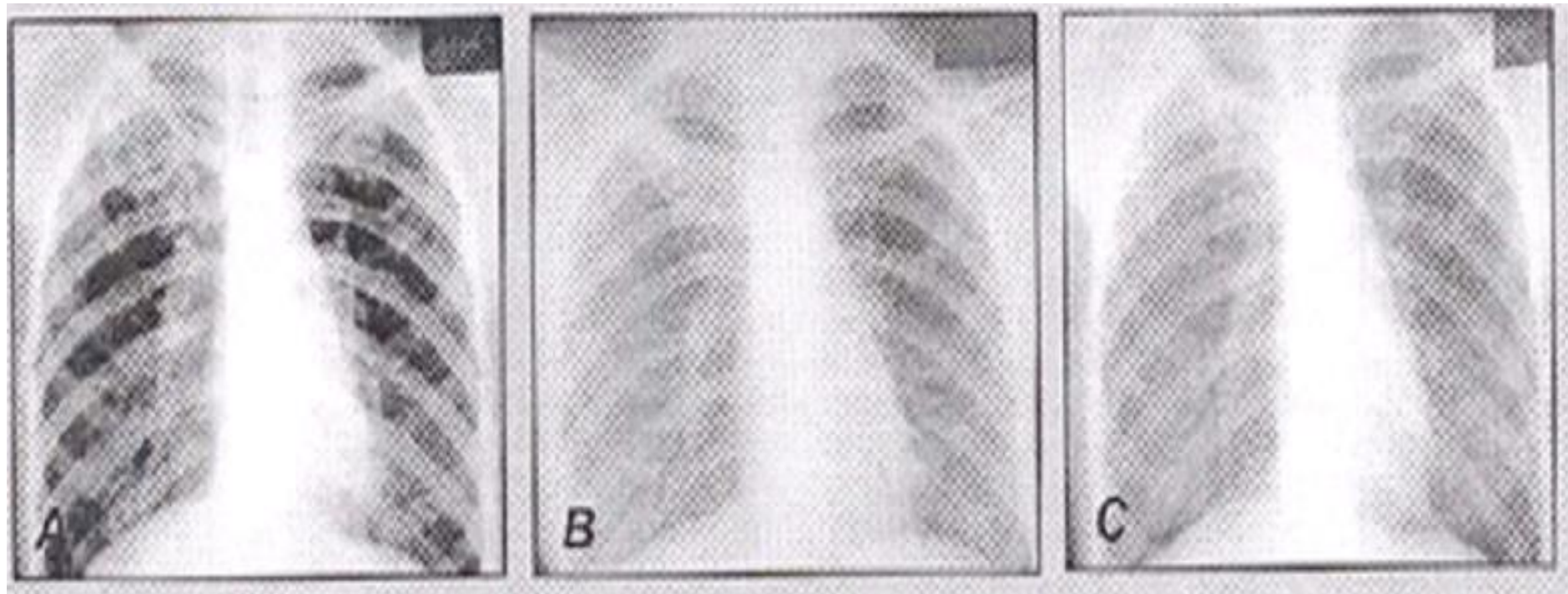
*Лечение повреждений  
крупных сухожилий*

# Схема создания костного графта

## (Скаффолд-технология)



# ЛЕЧЕНИЕ БОЛЬНЫХ С РЕЗИСТЕНТНЫМИ ФОРМАМИ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ АУТОГЕННЫМИ МСК КОСТНОГО МОЗГА



Рентгенограммы легких у пациентки до проведения системной трансплантации аутогенных МСК (А), а также через 6(В) и 17 месяцев (С) после трансплантации

