

## Лекция 2

# ТРЕБОВАНИЯ К ИСХОДНОМУ МАТЕРИАЛУ ДЛЯ СОЗДАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ НА ОСНОВЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

**Ярыгин Константин Никитич**

**д.б.н., член-корр. РАМН  
зав. лаб. клеточной биологии  
ФГБУ «ИБМХ» РАМН**

# Типы клеток, активно используемые в настоящее время для создания медицинских клеточных технологий

- Постнатальные гемопоэтические стволовые клетки, выделенные из костного мозга или мобилизованной периферической крови.
- Постнатальные мезенхимальные стволовые клетки, выделенные из костного мозга, жировой ткани, молочных зубов и других источников.
- «Мультипотентные взрослые прогениторные клетки» (multipotent adult progenitor cells – MAPCs) из костного мозга и мобилизованной периферической крови.
- Постнатальные нейральные стволовые клетки, выделенные из обонятельного эпителия.
- Постнатальные дифференцированные клетки (фибробласты, гепатоциты, бета-клетки и др.).
- Стволовые и прогениторные клетки пуповинной крови.
- Суспензия изолированных, но не культивированных фетальных клеток.
- Фетальные стволовые и прогениторные клетки, в том числе фетальные мезенхимальные и нейральные стволовые клетки.
- Эмбриональные стволовые клетки.

Новое направление, разрабатываемое в лаборатории медицинских клеточных технологий РГМУ и в лаборатории клеточной биологии НИИ биомедицинской химии РАМН:

Создание клеточных препаратов и медицинских клеточных технологий на основе использования клеток из Вартонова студня пуповины и клеток плода, выделенных из плаценты.

Сравнивались мезенхимальные СК, выделенные из следующих источников:

- Пунктат костного мозга взрослого человека.
- Пуповина (Вартонов студень) после нормальных родов.
- Амнион и амниотическая жидкость после нормальных родов.
- Хорион (фетальные клетки) после нормальных родов.

Полное представление о поведении клеточного препарата в условиях *in vivo* могут дать только результаты экспериментов на животных или клинических испытаний. Однако многие ответы могут быть получены в опытах *in vitro* путем исследования экспрессии белков-маркеров цитофенотипов и способности клеток вступать на тот или иной путь дифференцировки.

Маркерные белки определяли иммуноцитохимически или иммуноцитофлюорометрически. Дифференцировку проводили в культуре.

## Сравнение свойств МСК, выделенных из тканей взрослого человека, фетальных тканей и экстраэмбриональных органов, как материала для аллотрансплантации

Источник МСК	Содержание СК и прогениторных клеток	Этические проблемы	Возможность стандартизации	Вероятность осложнений при аллогенной трансплантации
Ткани взрослого	Низкое	Отсутствуют	Существует, но достижима с трудом	Высока, обычно необходима иммуносупрессия
Фетальные ткани	Высокое	Существенные	Достижима для fetusов одинакового возраста	Вероятность иммунологических проблем невелика, но при использовании клеток ранних fetusов существует риск формирования тератом и тератокарцином
Пуповина (Вартонов студень) или плацента (амнион, хорион – клетки плода)	Высокое	Отсутствуют	Легко достижима	Невелика

# Экспрессия маркерных белков МСК из разных источников

CD	Другие названия	МСК из костного мозга	Плацента, лит. данные	Плацента, собств. данные	Пуповина, собств. данные
CD10	gp100, enkephalinase, neprilysin	?	?	+	+
CD13	gp150, aminopeptidase N	+	+	+	+
CD29	VLA- $\beta$ , integrin $\beta$ 1	+	+	+	?
CD31	PECAM-1, endocam	+	+	+ (BD) - (Caltag)	?
CD44	H-CAM, phagocytic glycoprotein 1	+	+	+	+
CD49b	VLA-2 $\alpha$ , integrin $\alpha$ 2	?	?	+	$\pm$
CD49e	VLA-5 $\alpha$ , integrin $\alpha$ 5	+	?	?	?
CD54	ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1	+	+	+	+
CD55	DAF, decay accelerating factor	?	?	+	?
CD90	Thy-1	+	?	+	+
CD95	Fas, Apo-1	?	?	+	?
CD105	Endoglin	+	+	+	+
CD106	VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1	+	?	$\pm$	-
CD117	C-KIT, SCFR, stem cell factor receptor	-	-	-	+
CD166	ALCAM, activated leucocyte cell adhesion molecule	+	+	-	?

# Экспрессия маркерных белков МСК из разных источников (продолжение)

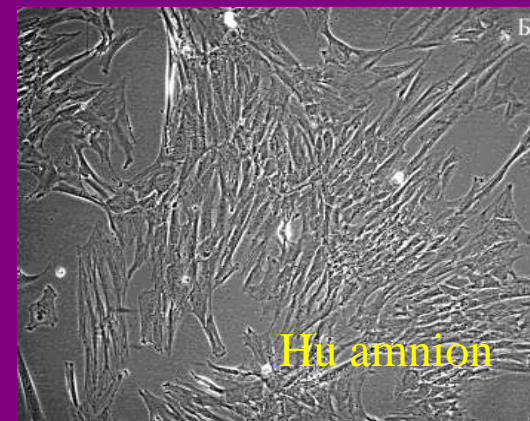
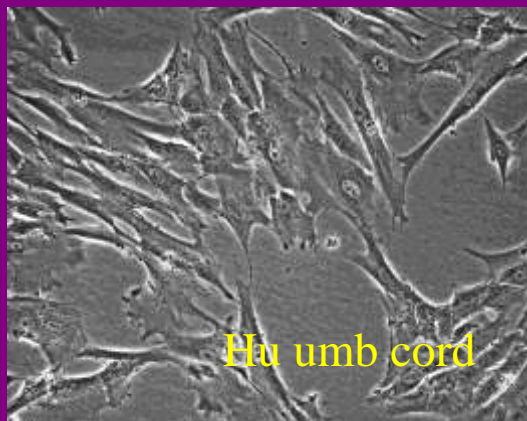
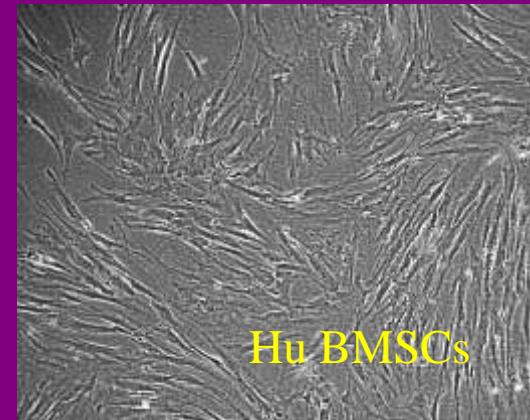
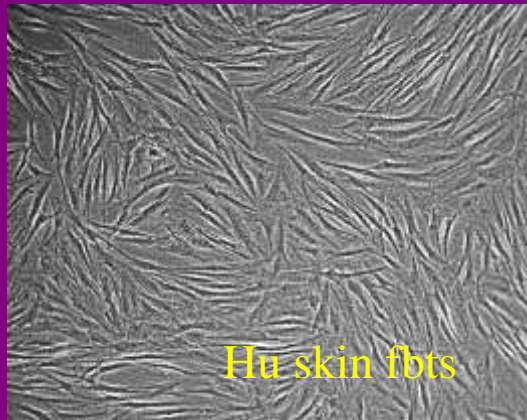
CD	Другие названия	МСК из костного мозга	Плацента, лит. данные	Плацента, собств. данные	Пуповина, собств. данные
CD14	LPC-R, lipopolysaccharide receptor	-	-	-	?
CD24	HAS, heat stable antigen, BA-1	?	?	-	?
CD25	IL-2R $\alpha$ , receptor for IL-2 receptor $\alpha$ -subunit	?	?	-	?
CD34	C4bR, CR1, complement receptor type 1, immune adherence receptor	-	-	-	-
CD38	T10, ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP ribose hydrolase	?	?	-	?
CD40	BP50	?	?	-	?
CD45	LCA, leucocyte common antigen	-	-	-	-
CD49d	VLA-4 $\beta$ , integrin $\alpha$ 4 $\beta$ 1	-	?	?	?
CD57	HNK-1, Leu7	?	?	-	?
CD71	T9, transferrin receptor	?	?	-	?
CD123	IL-3R $\alpha$	?	?	-	?
CD133	AC133, PROML-1, hematopoietic stem cell antigen	-	-	-	-



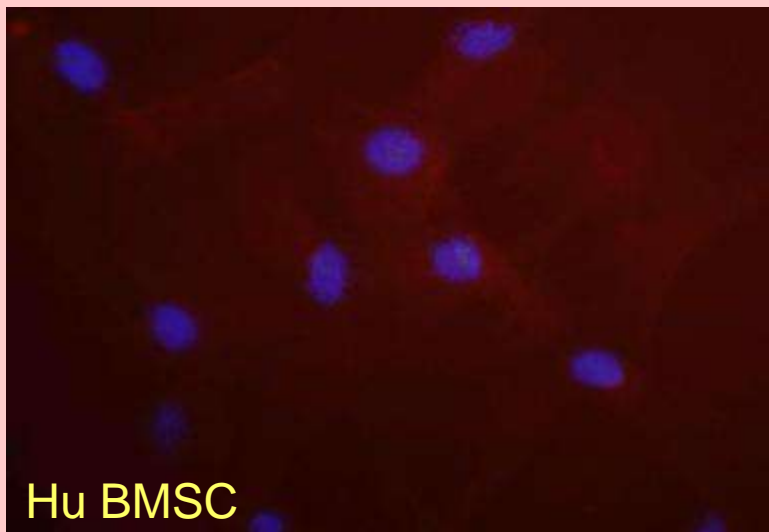
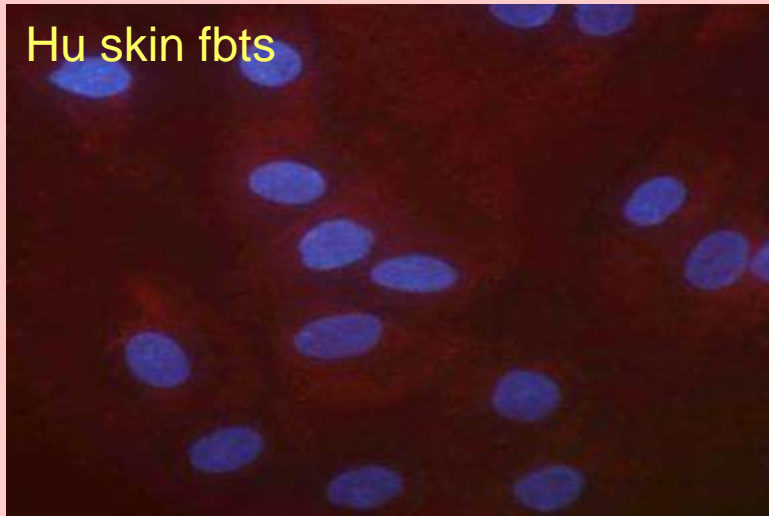
## Экспрессия белков главного комплекса гистосовместимости МСК из разных источников

Тип HLA	МСК из костного мозга	Плацента, лит. данные	Плацента, собств. данные	Пуповина, собств. данные
HLA-ABC	+	+	+	+
HLA-DR	-	-	-	-

Cell cultures of skin fibroblasts, bone marrow stromal cells,  
and fibroblast-like cells from the umbilical cord and placenta



# Nestin Expression in Cell Cultures

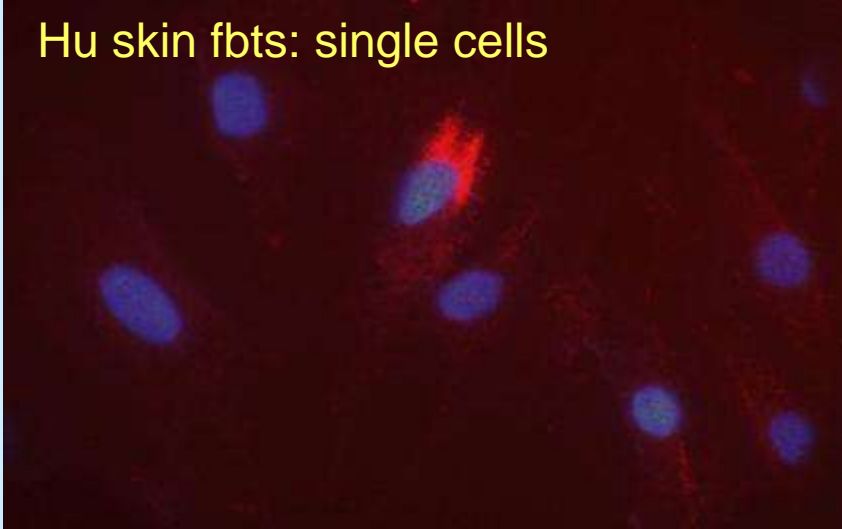


Hu skin fbts: no expression. Hu BMSC: no expression. Hu umb cord: expression in most cells; % of nestin-expressing cells and the level of expression decreased with increased cell density.

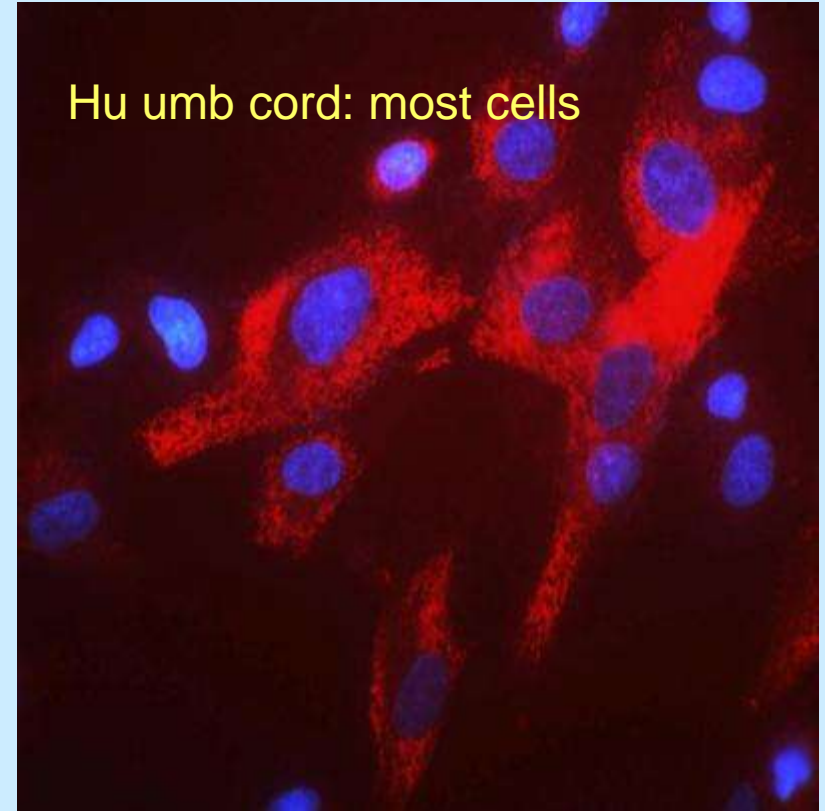


# Expression of **Collagen I** in Cultivated Human Cells

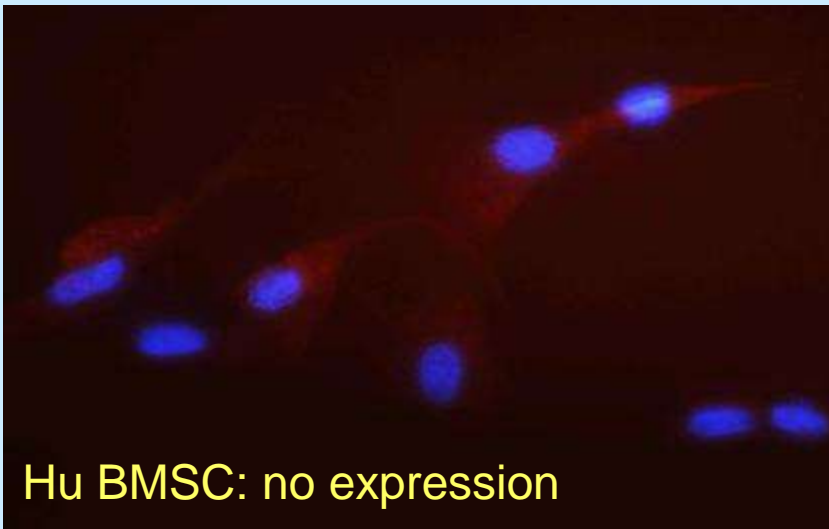
Hu skin fbts: single cells



Hu umb cord: most cells

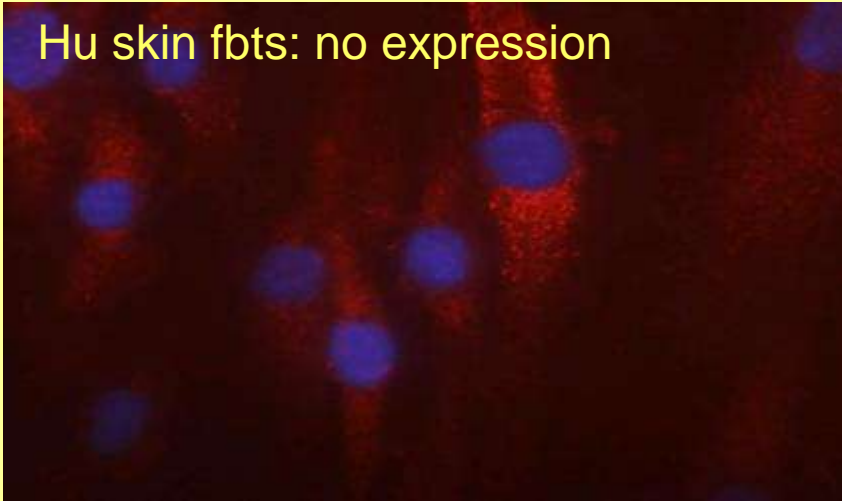


Hu BMSC: no expression

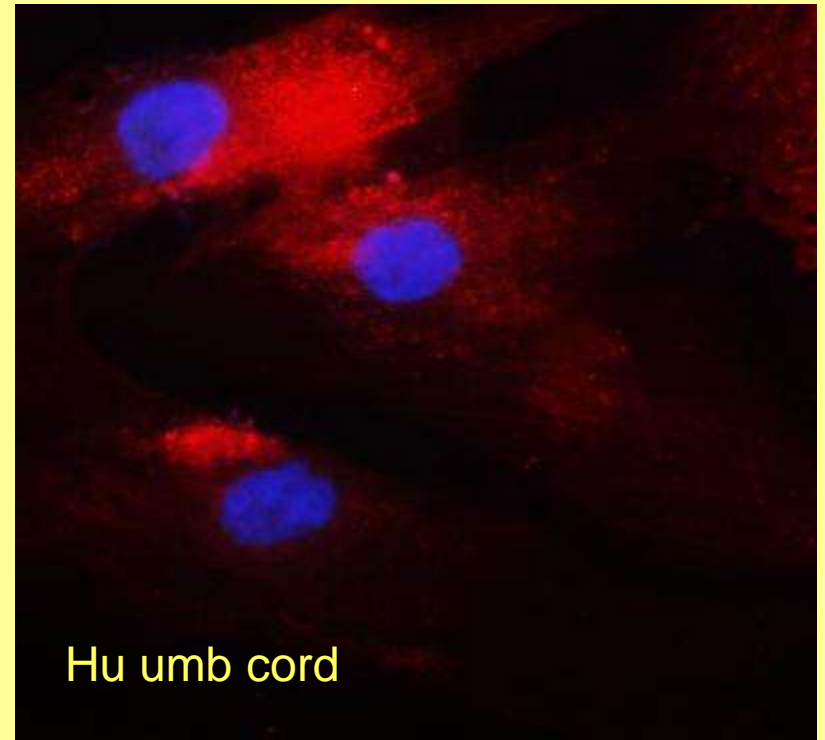


# Expression of **Collagen II** in Hu cells

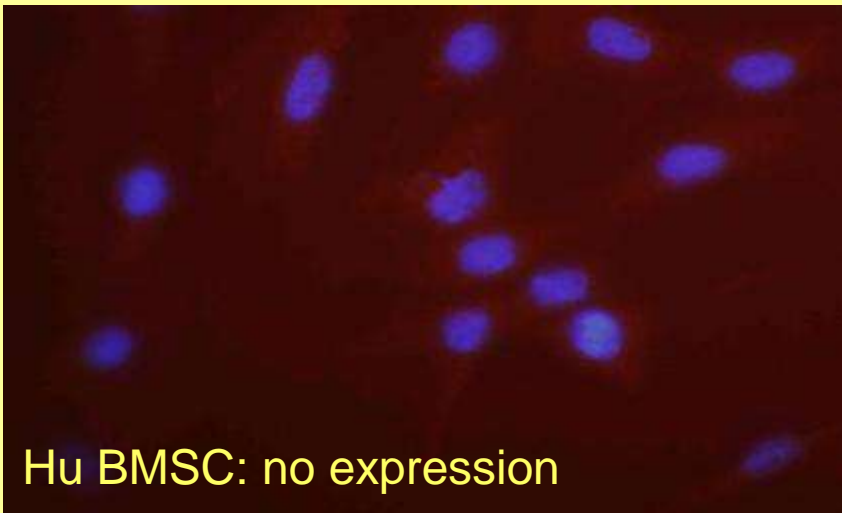
Hu skin fbts: no expression



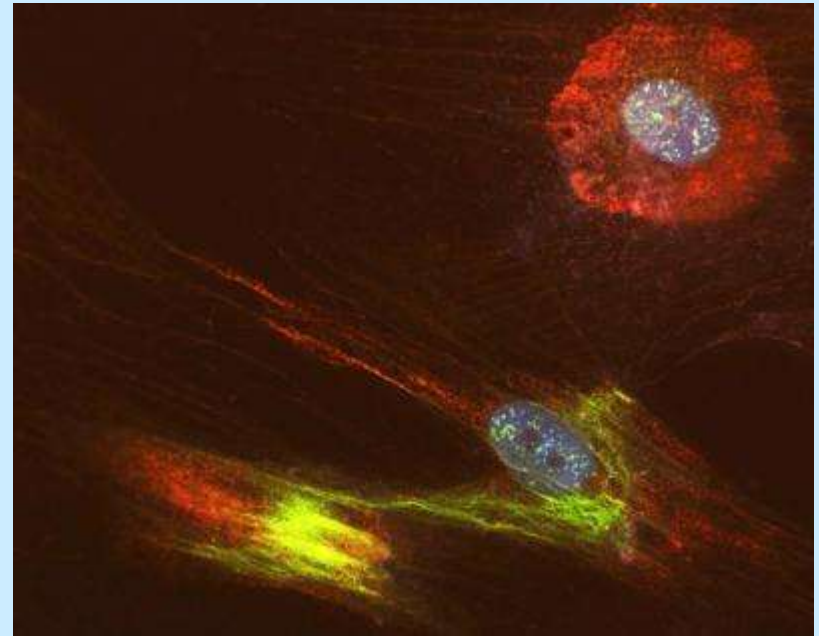
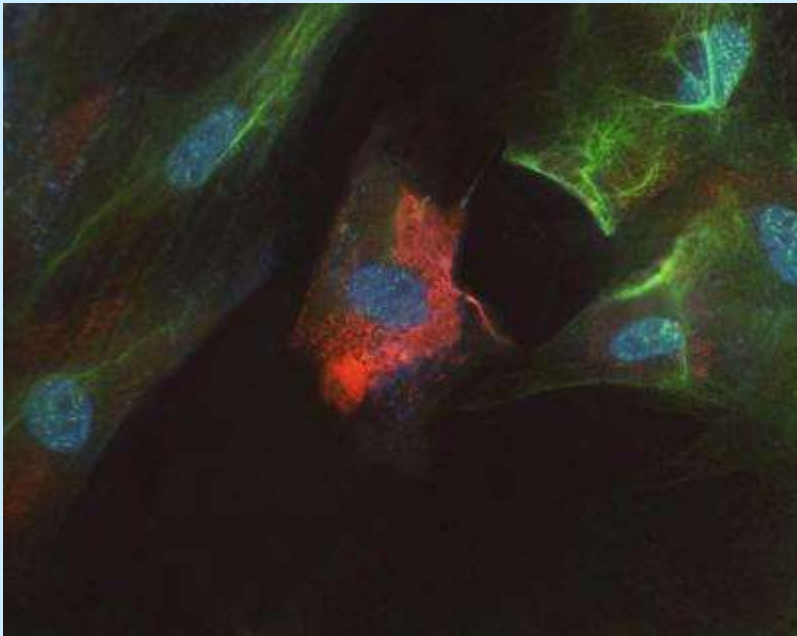
In Hu umb cord - most cells; expression did not depend on cell density, but increased with cultivation time.



Hu BMSC: no expression

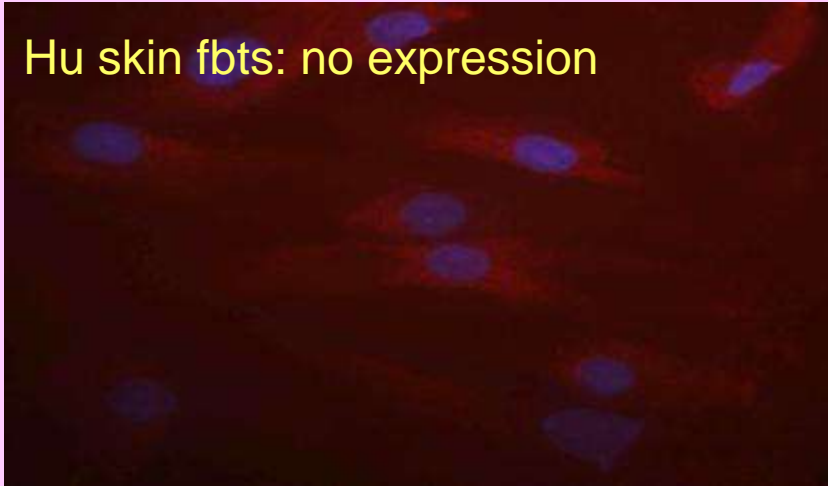


# Co-expression of Nestin (FITC) and Collagen II (Rhod) in Cultivated Human Umbilical Cord Cells

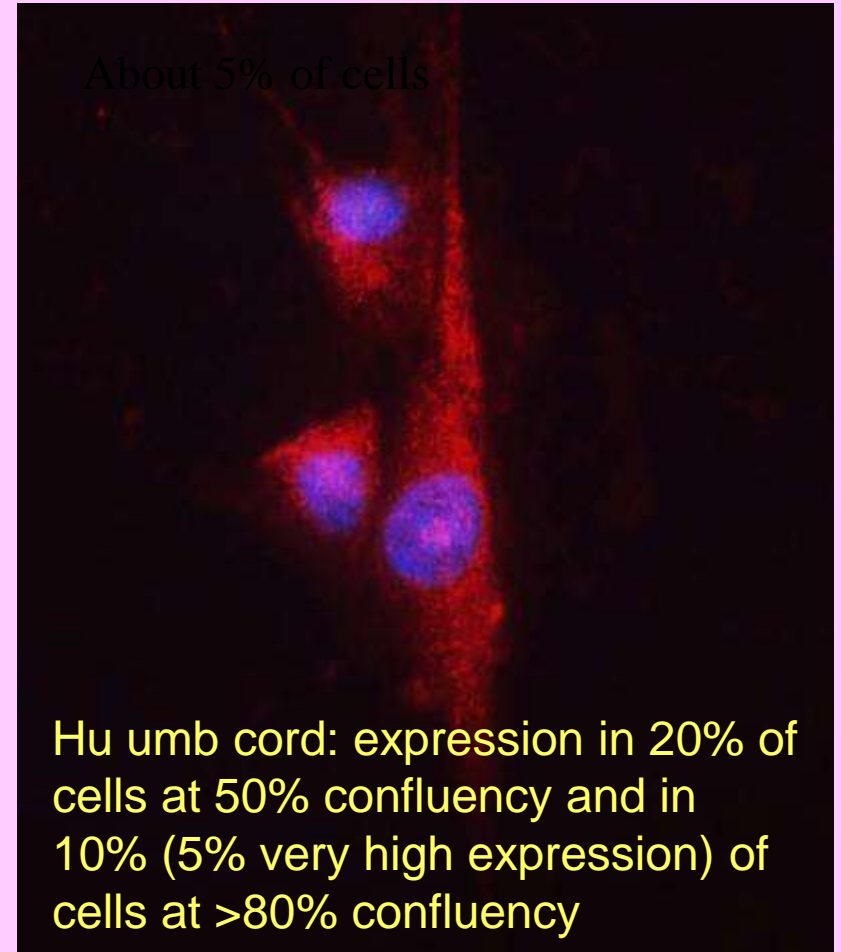


# Expression of VWB in Cultivated Human Cells

Hu skin fbts: no expression

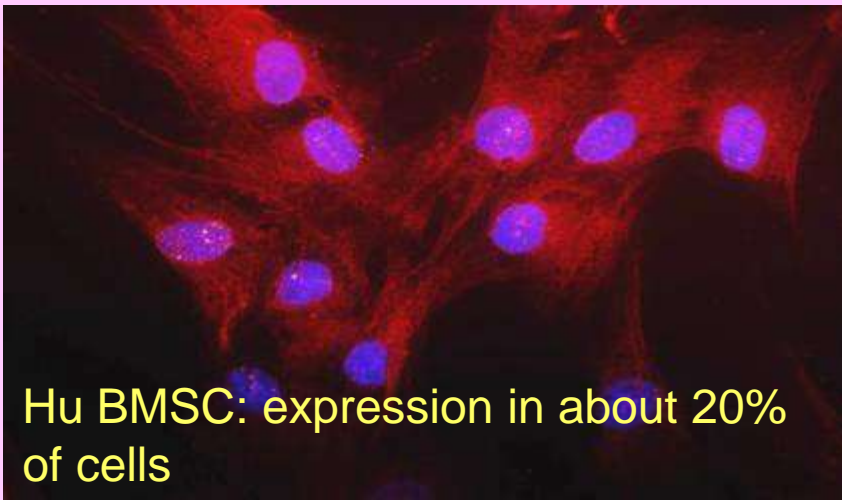


About 5% of cells



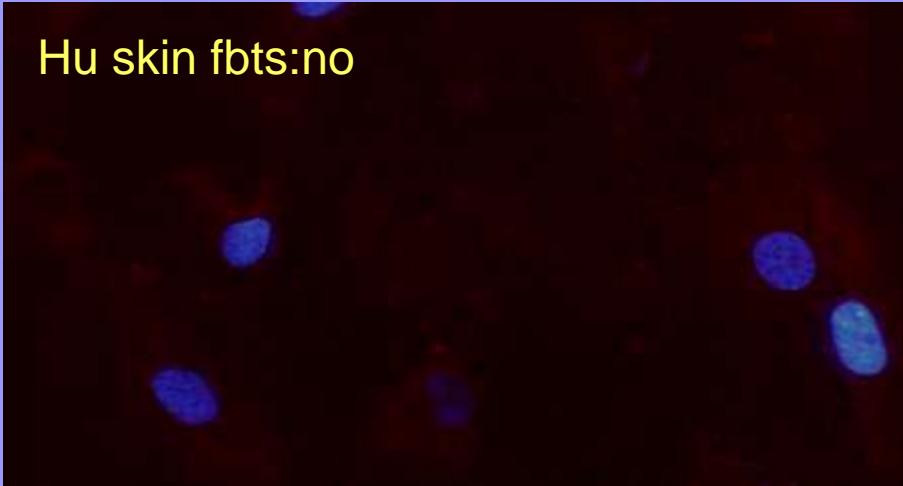
Hu umb cord: expression in 20% of cells at 50% confluency and in 10% (5% very high expression) of cells at >80% confluency

Hu BMSC: expression in about 20% of cells

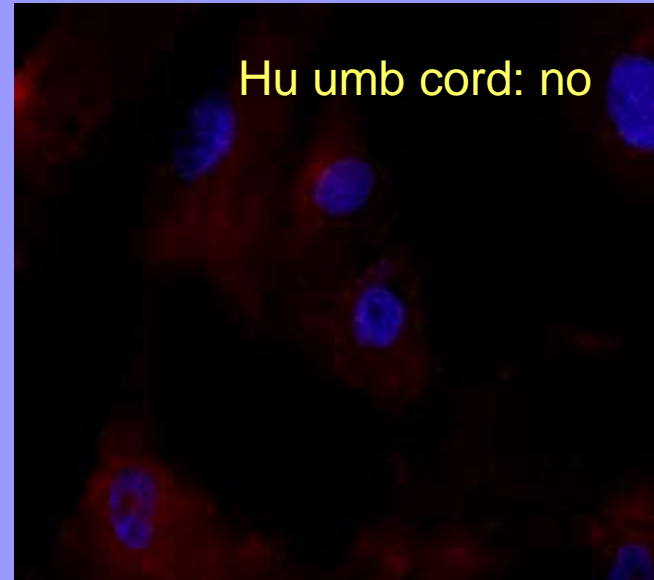


# Expression of CD106 (VCAM) in Hu cells

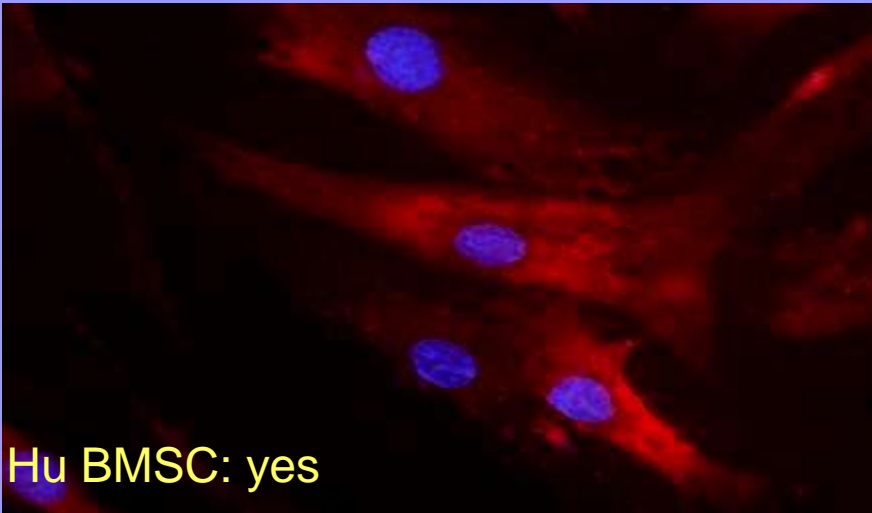
Hu skin fbts:no



Hu umb cord: no



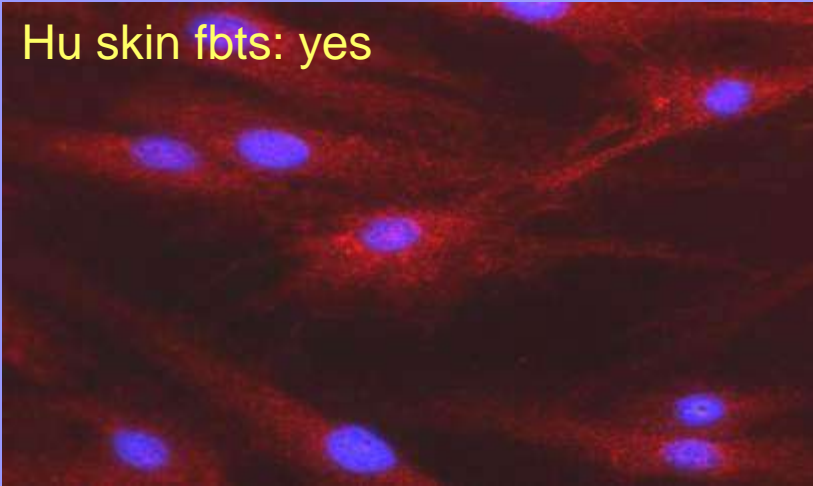
Hu BMSC: yes



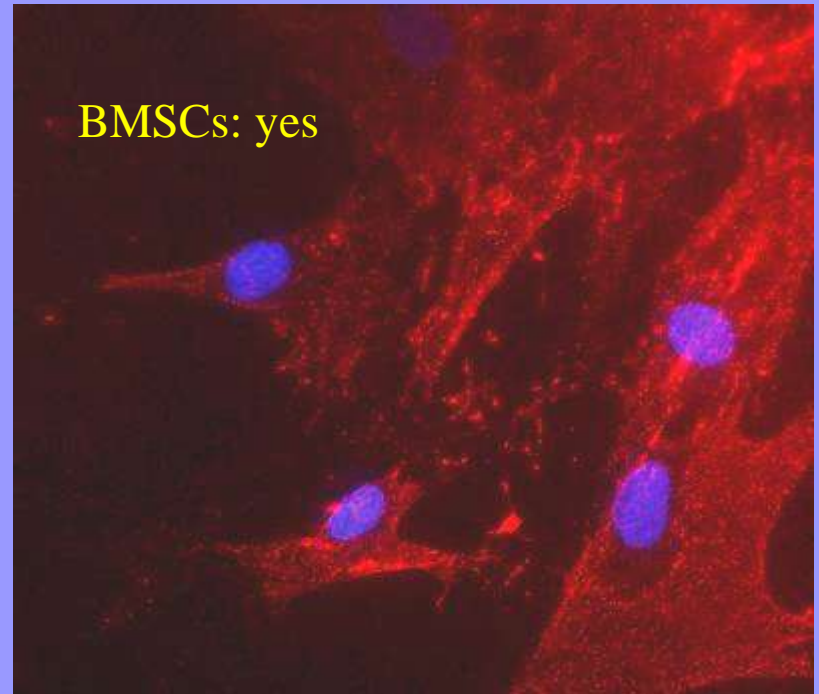


# Expression of **CD105** in Cultivated Human Cells

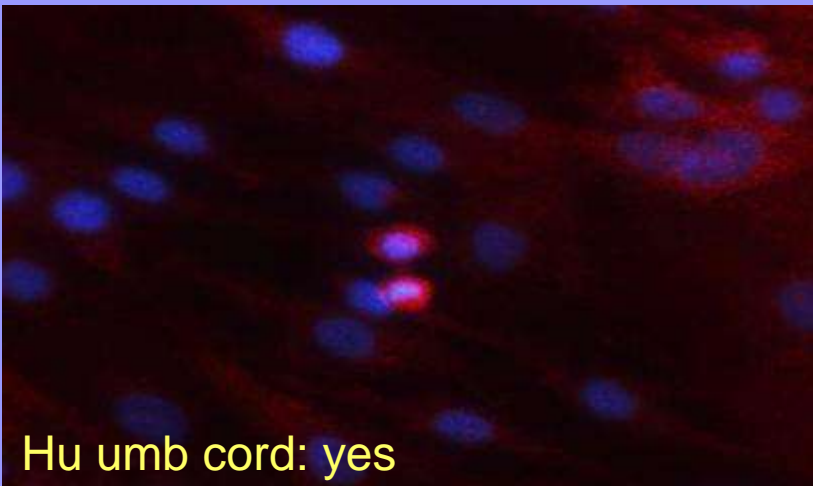
Hu skin fbts: yes



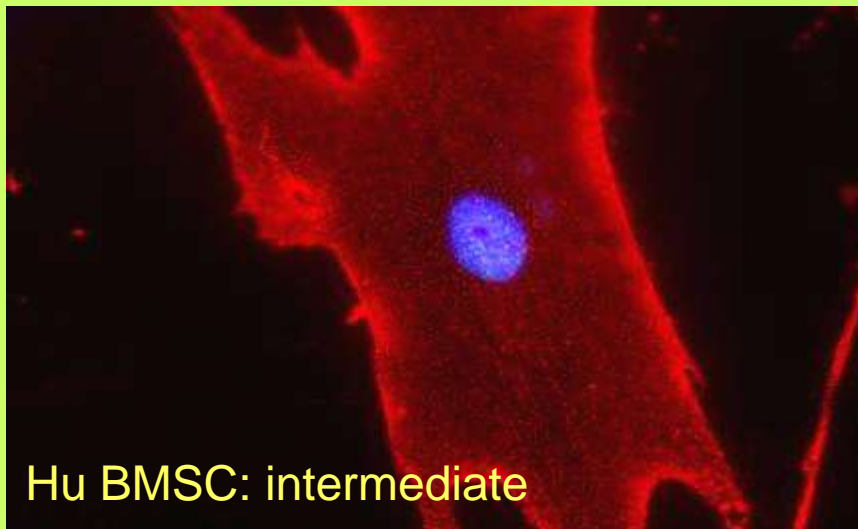
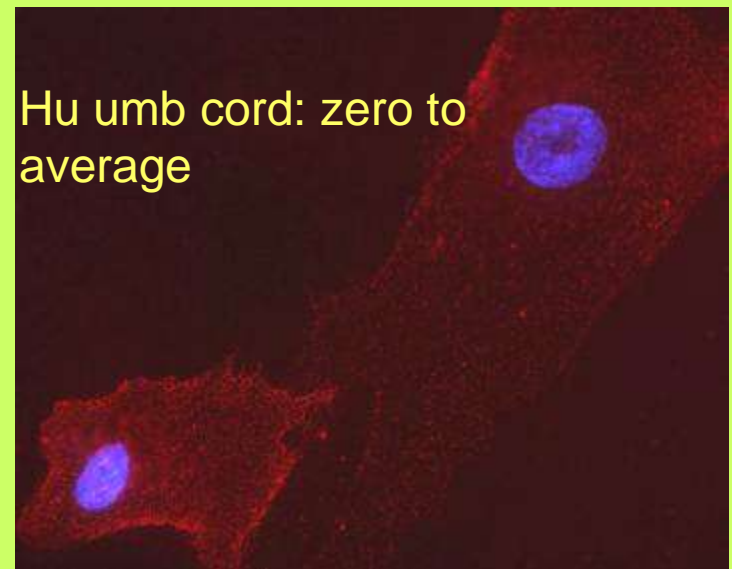
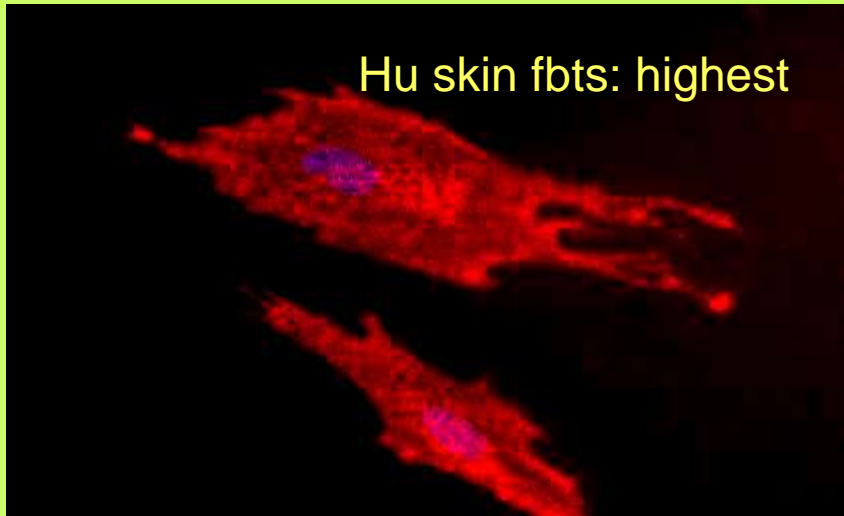
BMSCs: yes



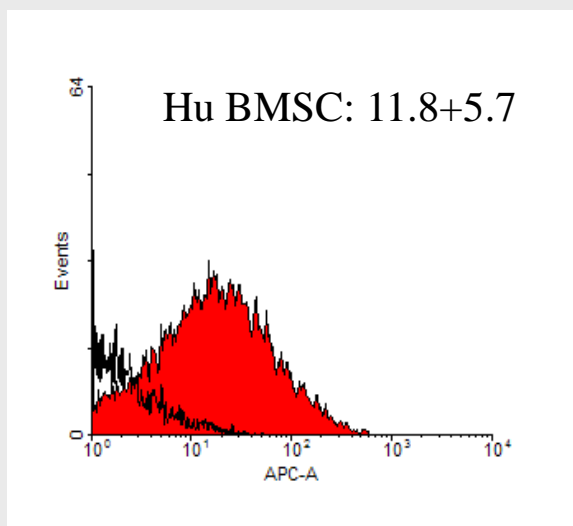
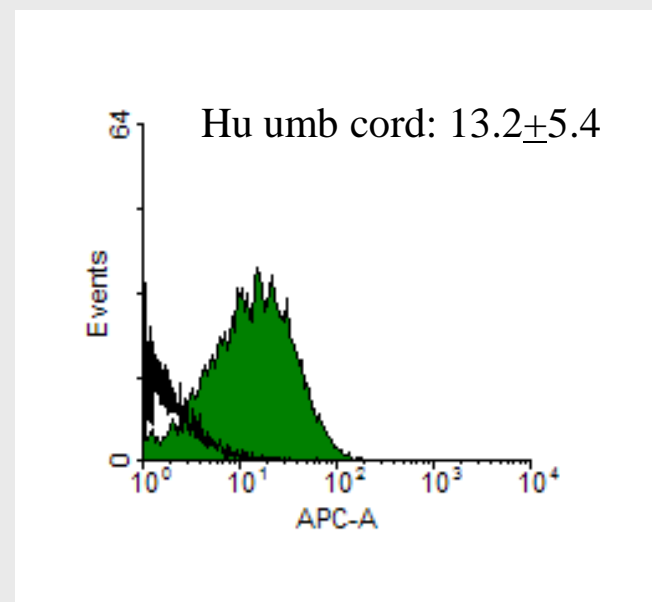
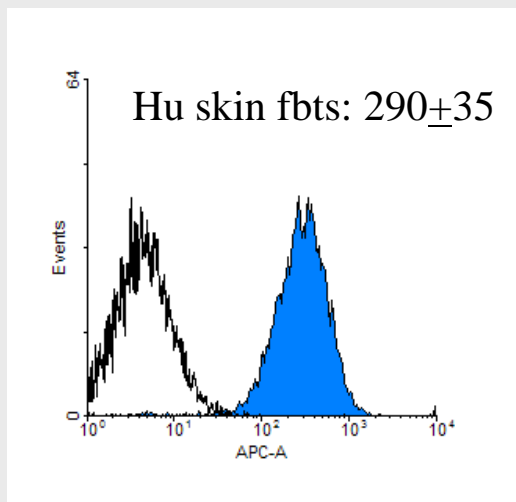
Hu umb cord: yes



# Expression of MHC Class I in Cultivated Human Cells



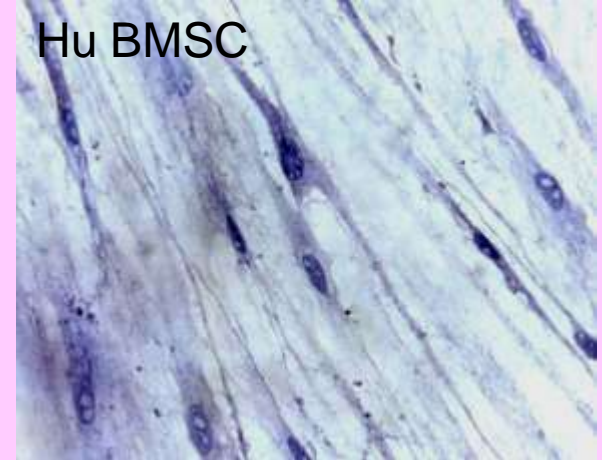
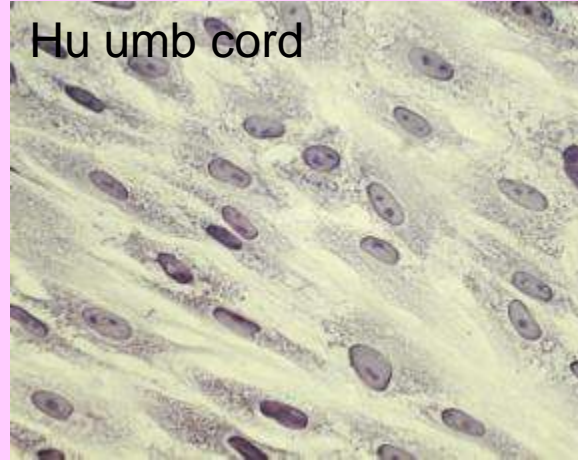
# Expression of MHC Class I in Cultivated Human Cells



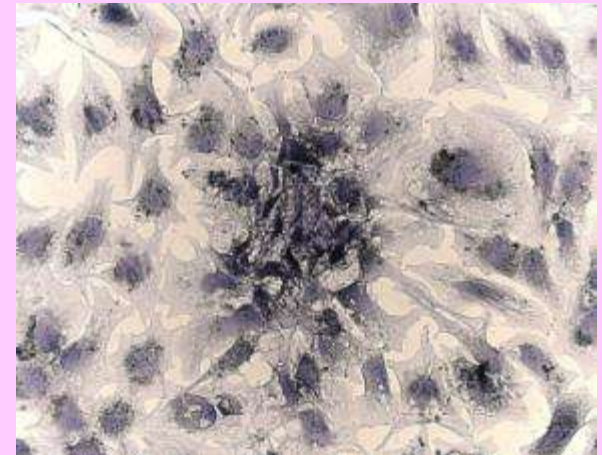
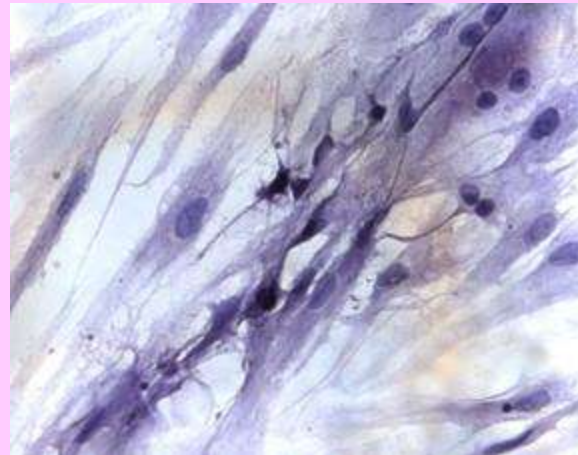
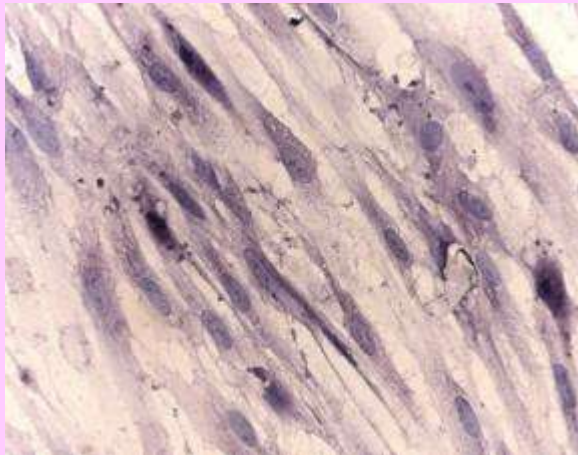


# Osteogenic differentiation (van Cossa staining, accumulation of $\text{Ca}^{2+}$ phosphates)

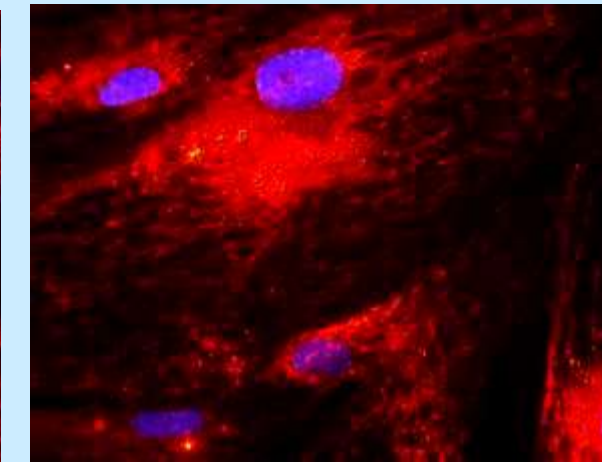
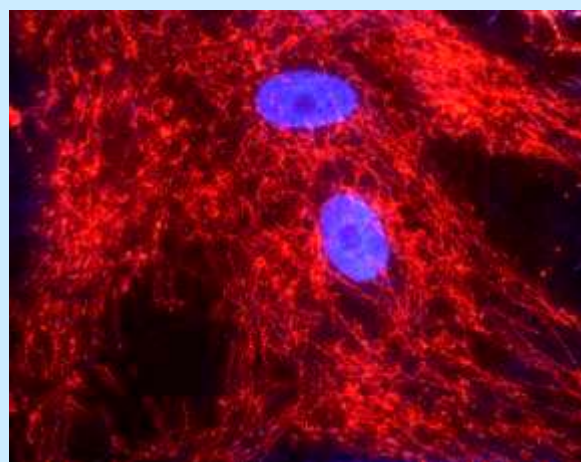
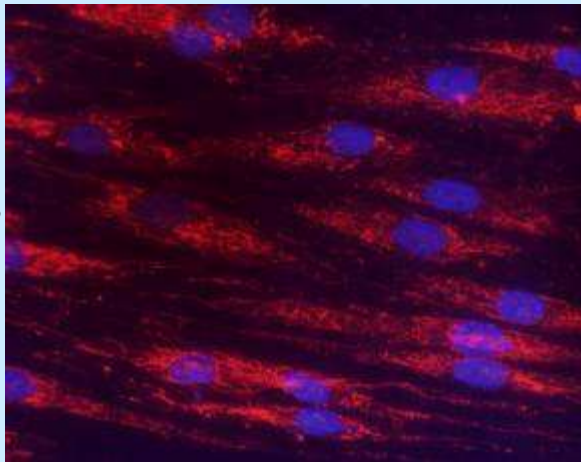
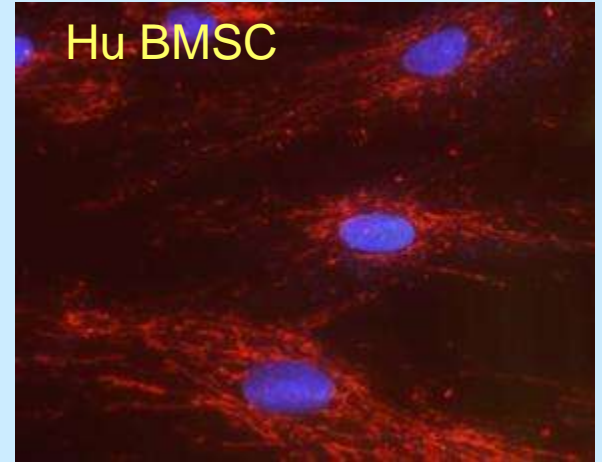
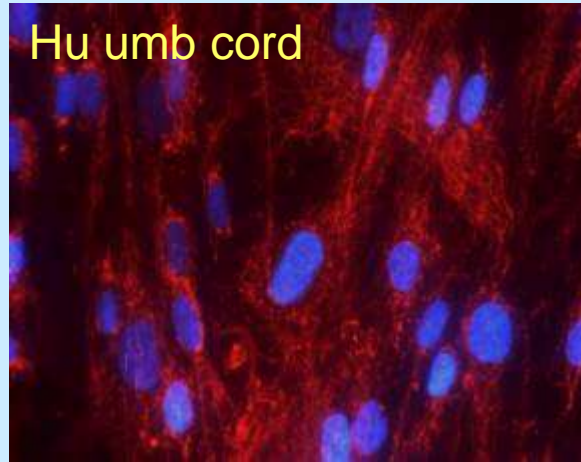
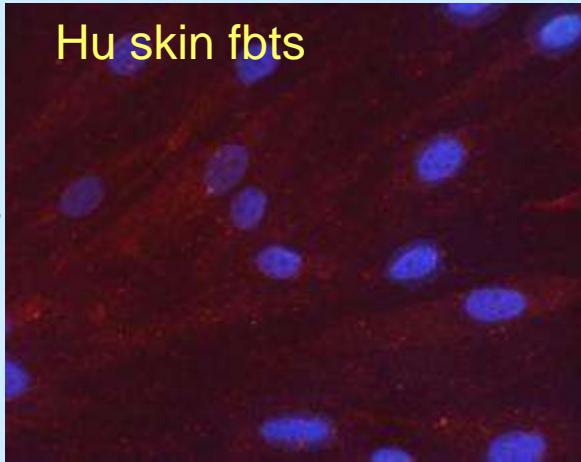
1 day



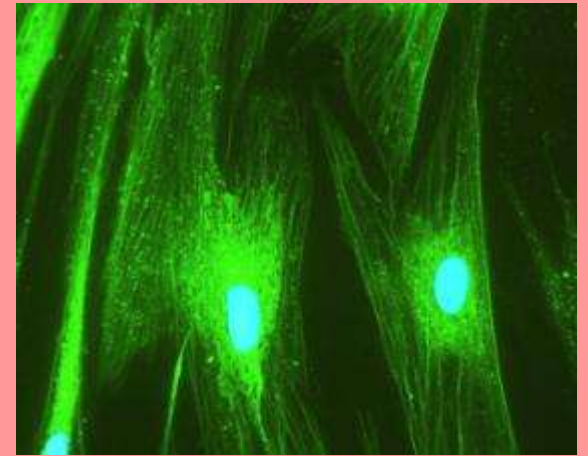
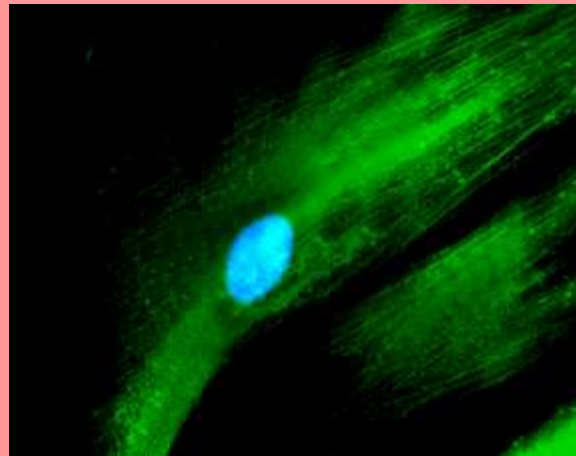
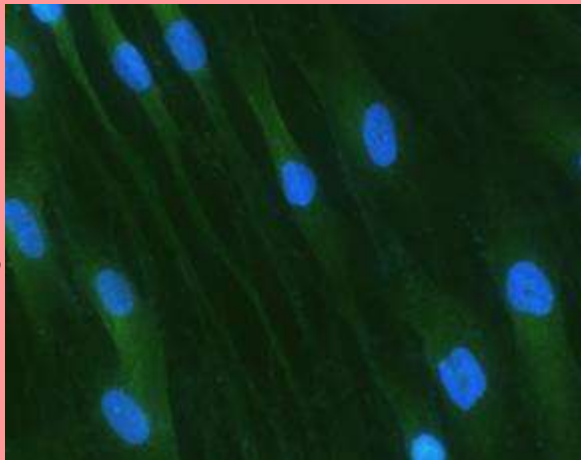
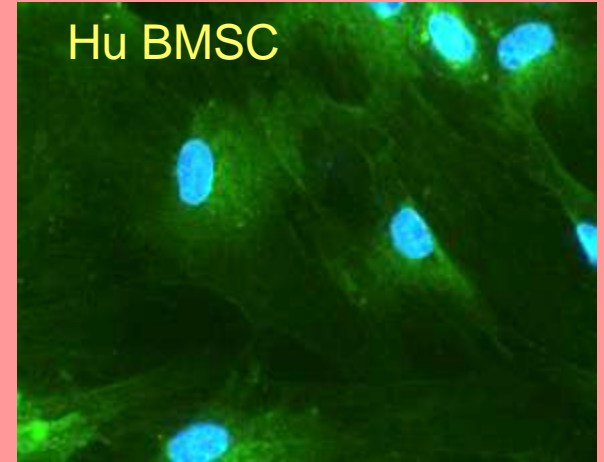
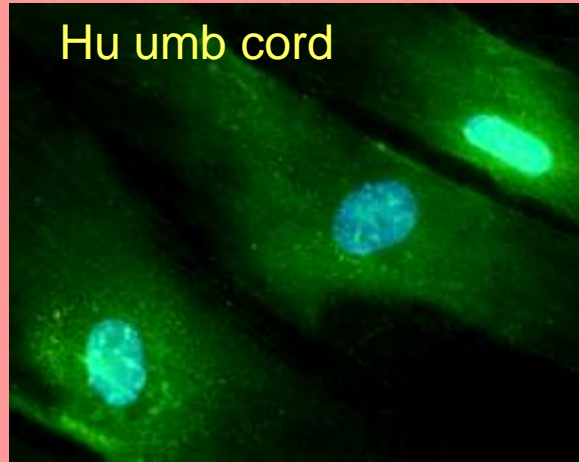
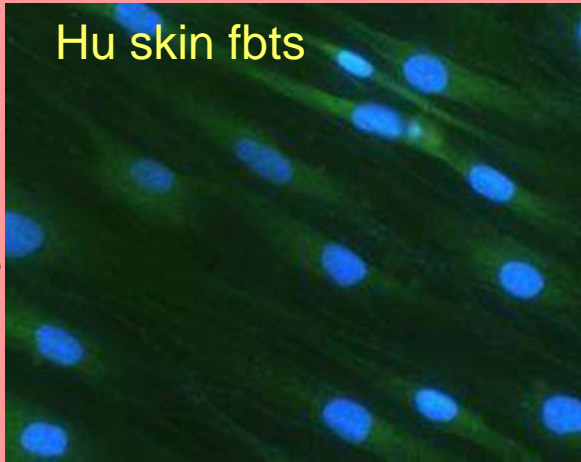
21 day



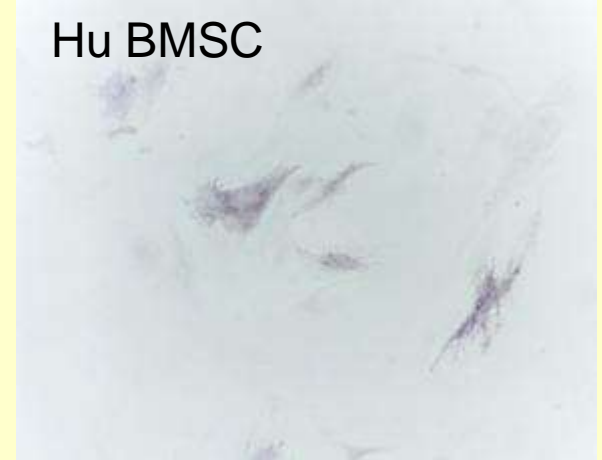
# Osteogenic Differentiation – Bone Sialoprotein Expression



# Osteogenic differentiation (osteonectin expression)



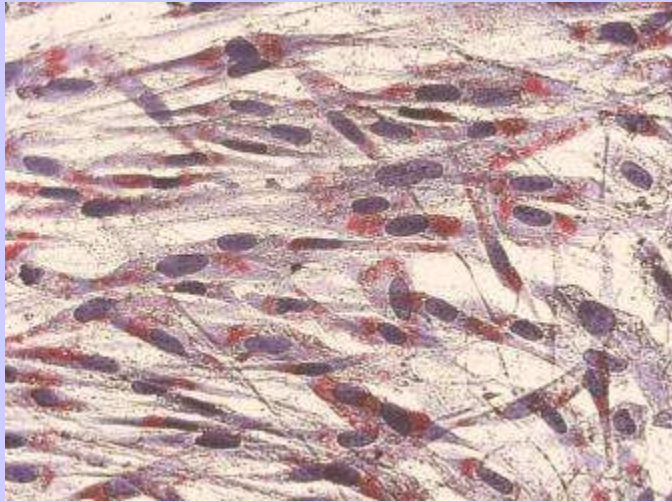
# Osteogenic differentiation (alkaline phosphatase staining)



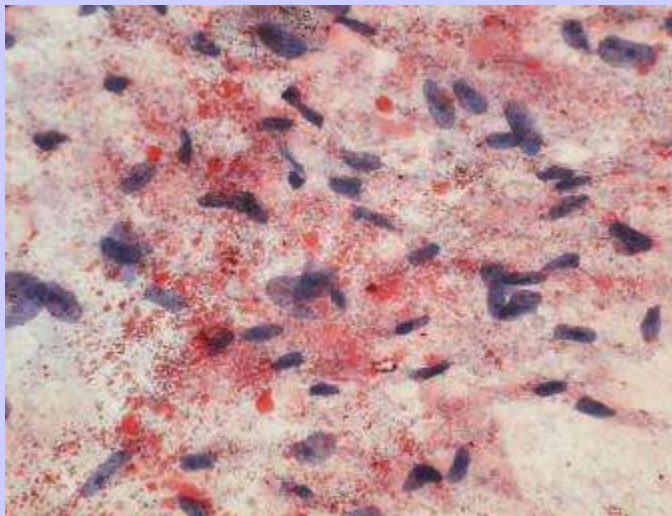
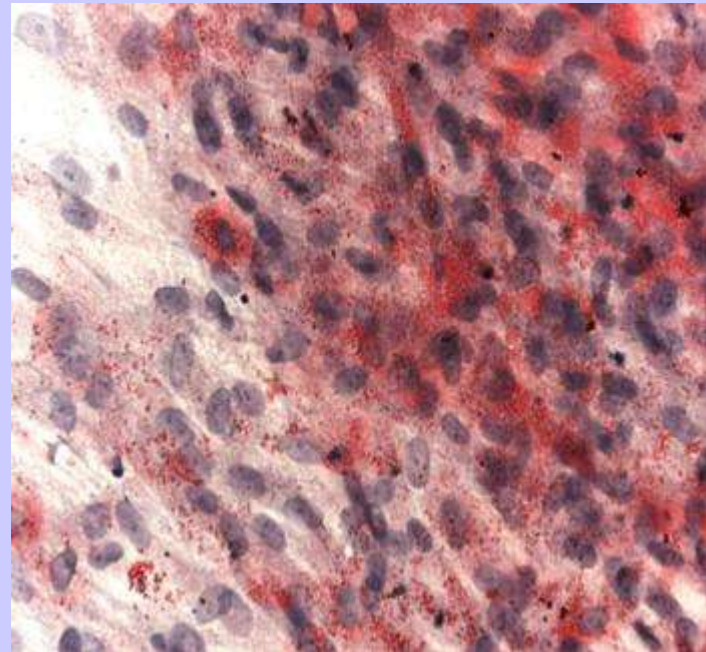


# Adipose differentiation – 14<sup>th</sup> day

Hu skin fbts: 100% of cells

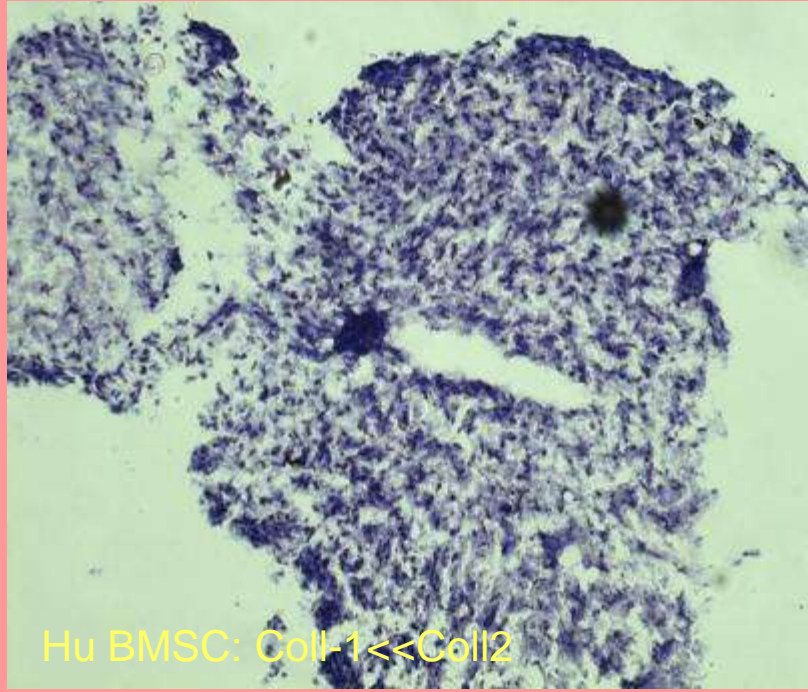
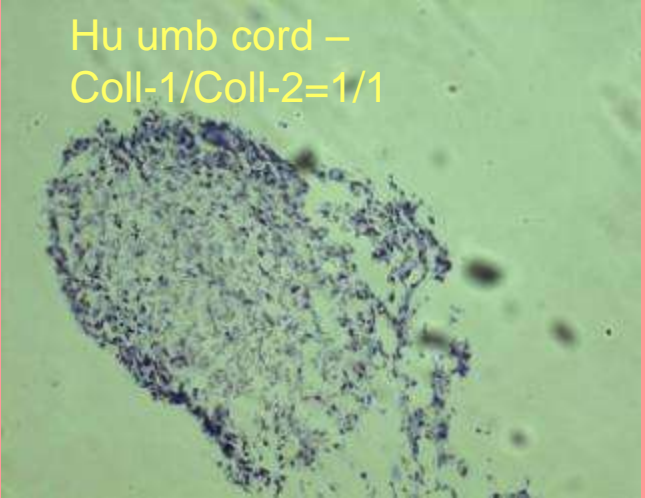


Hu BMSC: 100% of cells



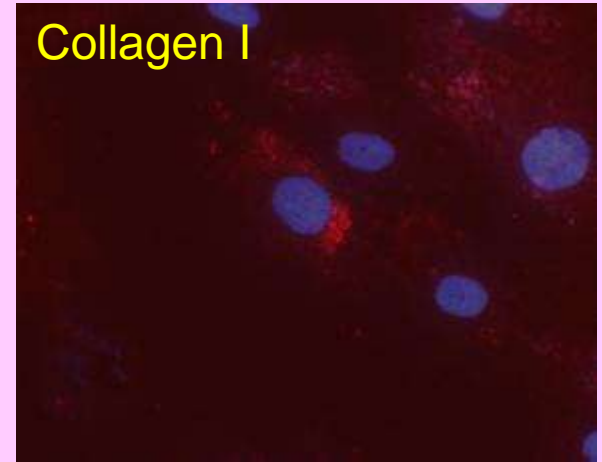
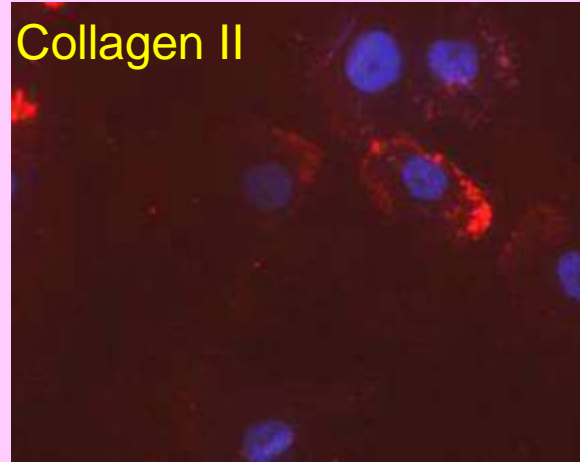
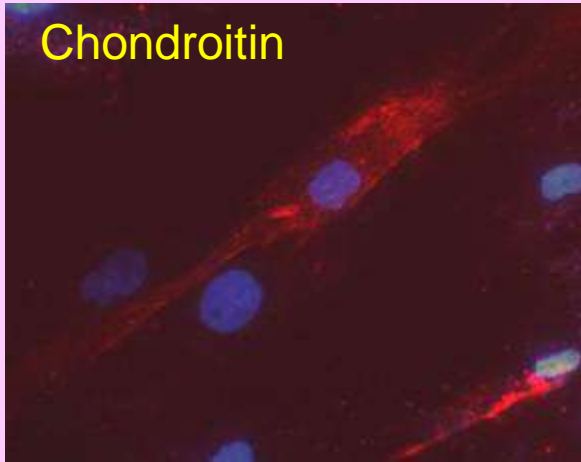
Hu umb cord: 100% of cells

# Chondrogenic differentiation with TGF-beta

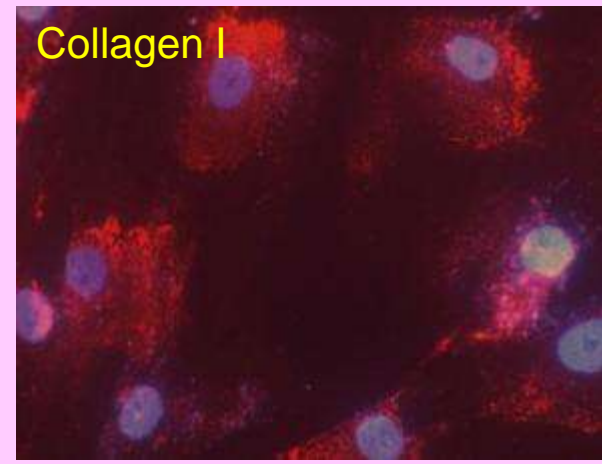
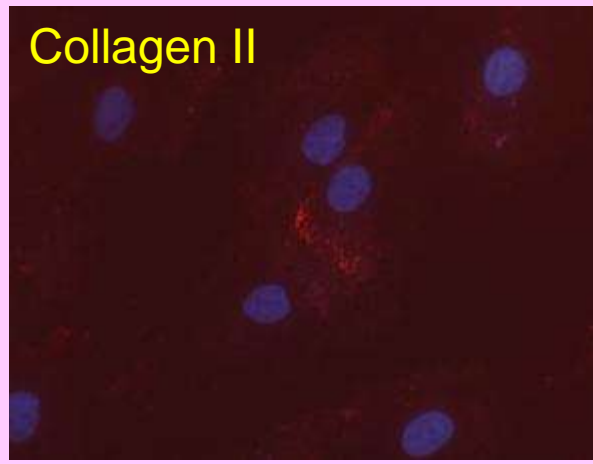
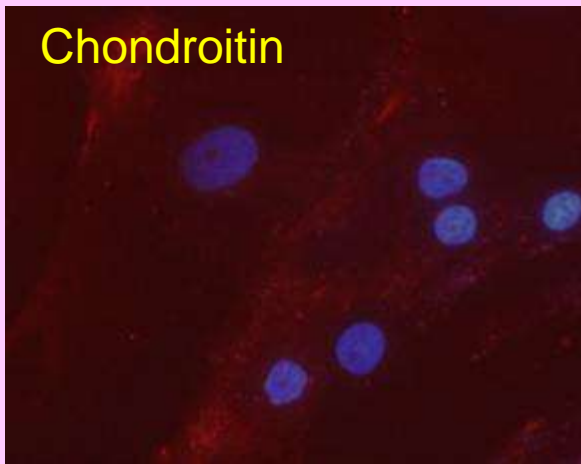


# Expression of **chondrogenic differentiation** markers in BMSC culture

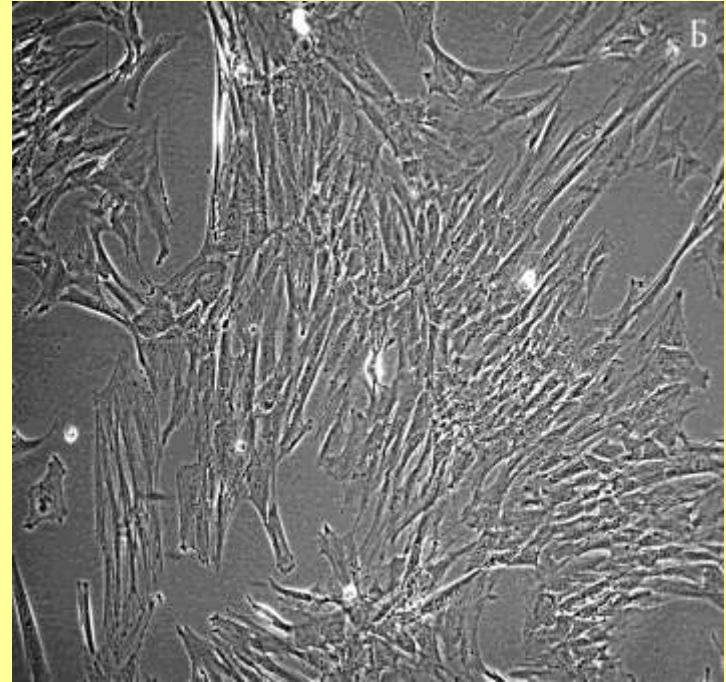
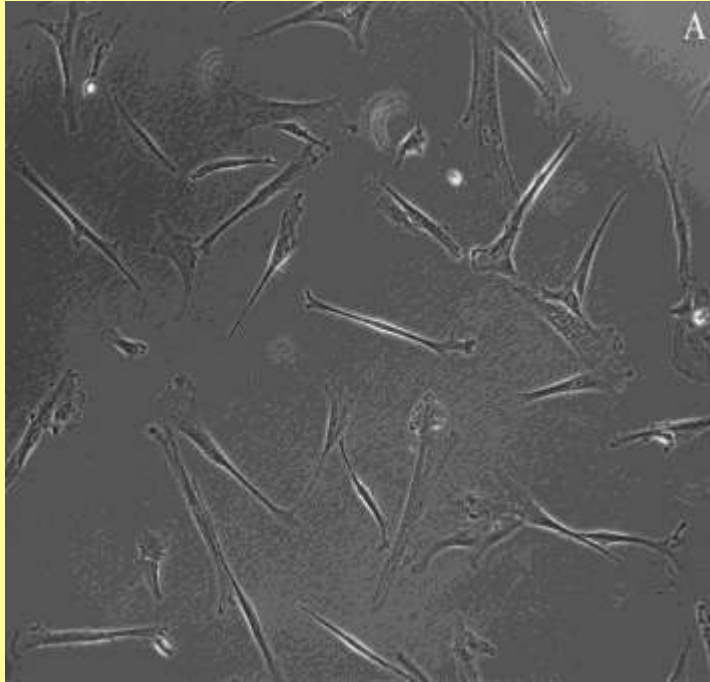
**With TGF- $\beta$**



**Without TGF- $\beta$**



## Морфологическая характеристика клеток, выделенных из плаценты человека



Морфология выделенных из амниона плаценты человека клеток в культуре на первых пассажах.

А – клетки, посаженные в низкой плотности

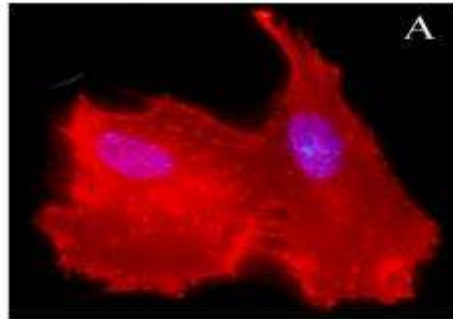
Б – клетки, достигшие 50%-ной конфлюентности

		Данные из литературных источников	Полученные данные
Фенотипические характеристики	CD54	+	+
	CD44	+	+
	CD90	+	+
	HLA-ABC	+	+
	HLA-DR	—	—
	CD34	—	—
Морфологические характеристики	на ранних пассажах	<b>фибробласто подобная</b>	<b>фибробласто подобная</b>
	на поздних пассажах	<b>распластанная</b>	<b>распластанная</b>
Пролиферативные свойства (в ответ на EGF, bFGF, FBS, Sn)		<b>пролиферируют</b>	<b>пролиферируют</b>
Способность дифференцироваться в зрелые клетки	остеоциты	+	+
	хондроциты	+	+
	адипоциты	+	+

# Фенотипическая характеристика клеток, выделенных из амниона плаценты человека

CD54 – ICAM1,  
intercellular adhesion  
molecule1

Мезенхимальные,  
эпителиальные клетки,  
активированные Т- и В-  
клетки

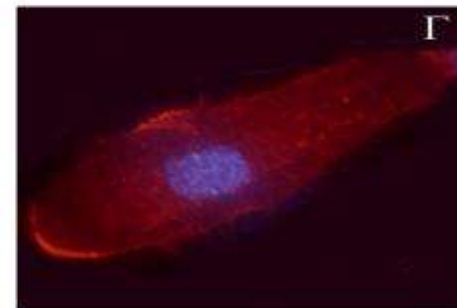
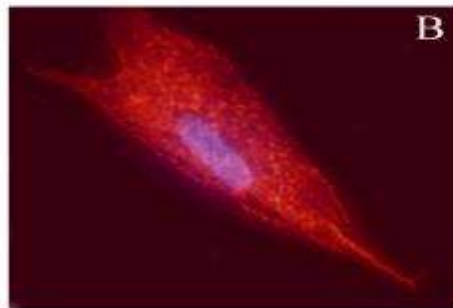


CD44 –  
phagocytic  
glycoprotein-1

Экспрессируется на  
большинстве клеток

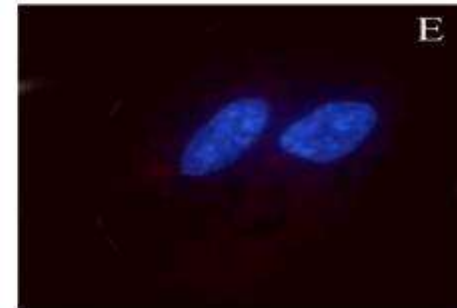
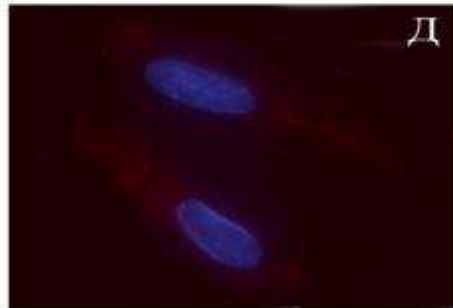
CD90 – Thy-1

Стволовые клетки,  
нейроны,  
соединительная ткань,  
фибробласты, тимоциты,  
клетки стромы



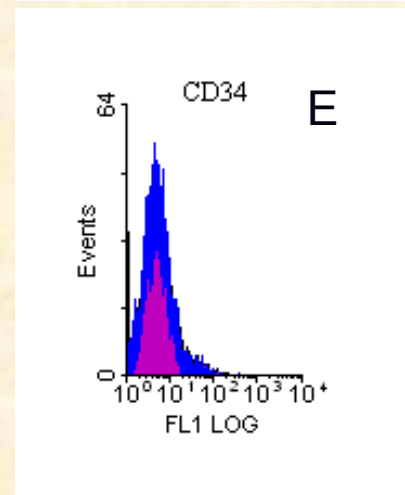
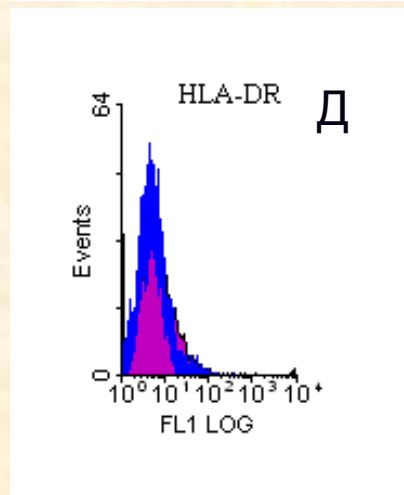
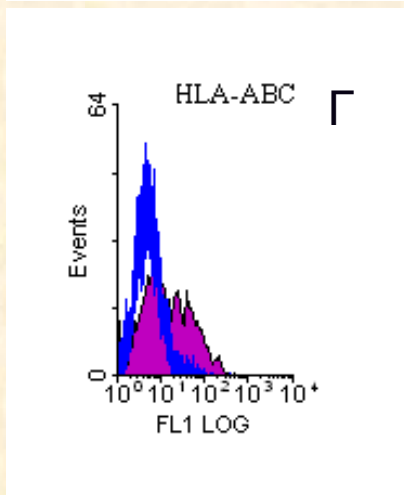
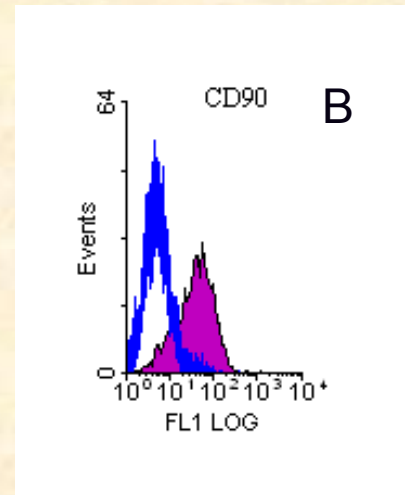
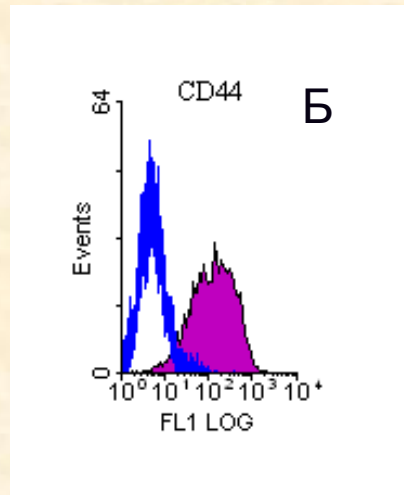
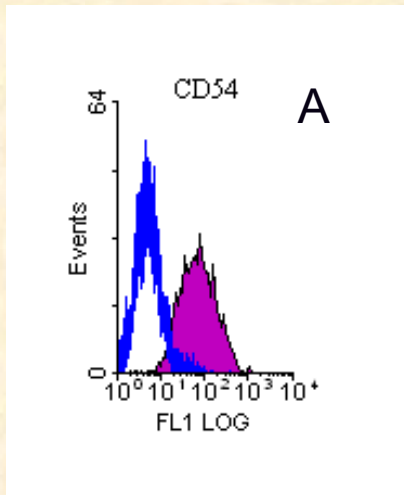
HLA-ABC

HLA-DR



CD34

Иммуноцитохимический анализ экспрессии поверхностных маркеров клетками, выделенными из амниона плаценты человека.



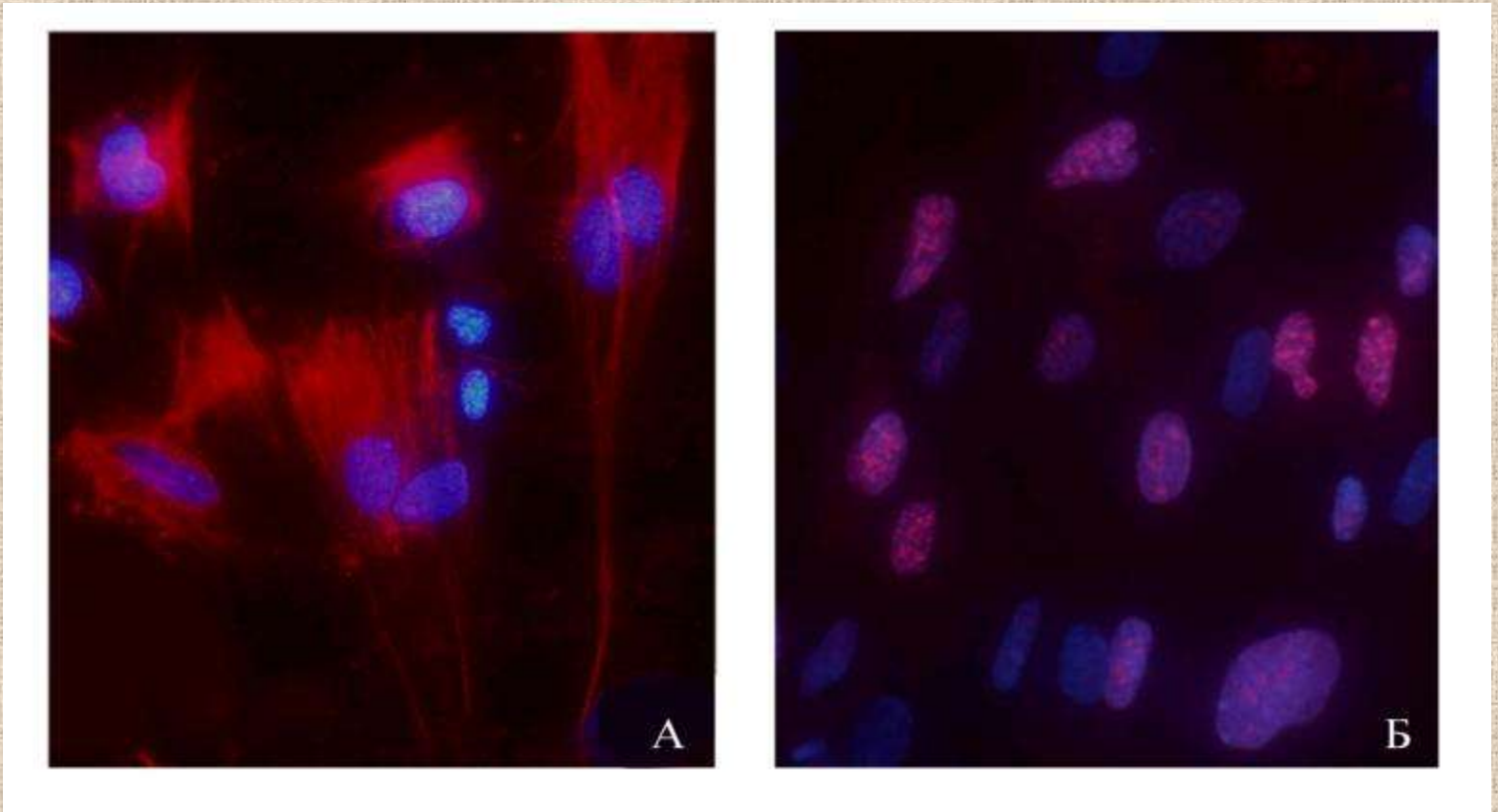
Цитофлуориметрический анализ экспрессии поверхностных антигенов клеток, выделенных из амниона плаценты человека.

А – окрашивание клеток антителами к CD54, Б – к CD44, В – к CD90, Г – к HLA-ABC, Д – к HLA-DR, Е – к CD34.

Фенотип клеток : CD54<sup>hi</sup> CD44<sup>hi</sup> CD90<sup>dim</sup> HLA-ABC<sup>lo</sup> HLA-DR<sup>-</sup> CD34<sup>-</sup>

# Функциональная характеристика клеток, выделенных из амниона человека, в культуре

Оценка клеток по маркерам стволовых и пролиферирующих клеток

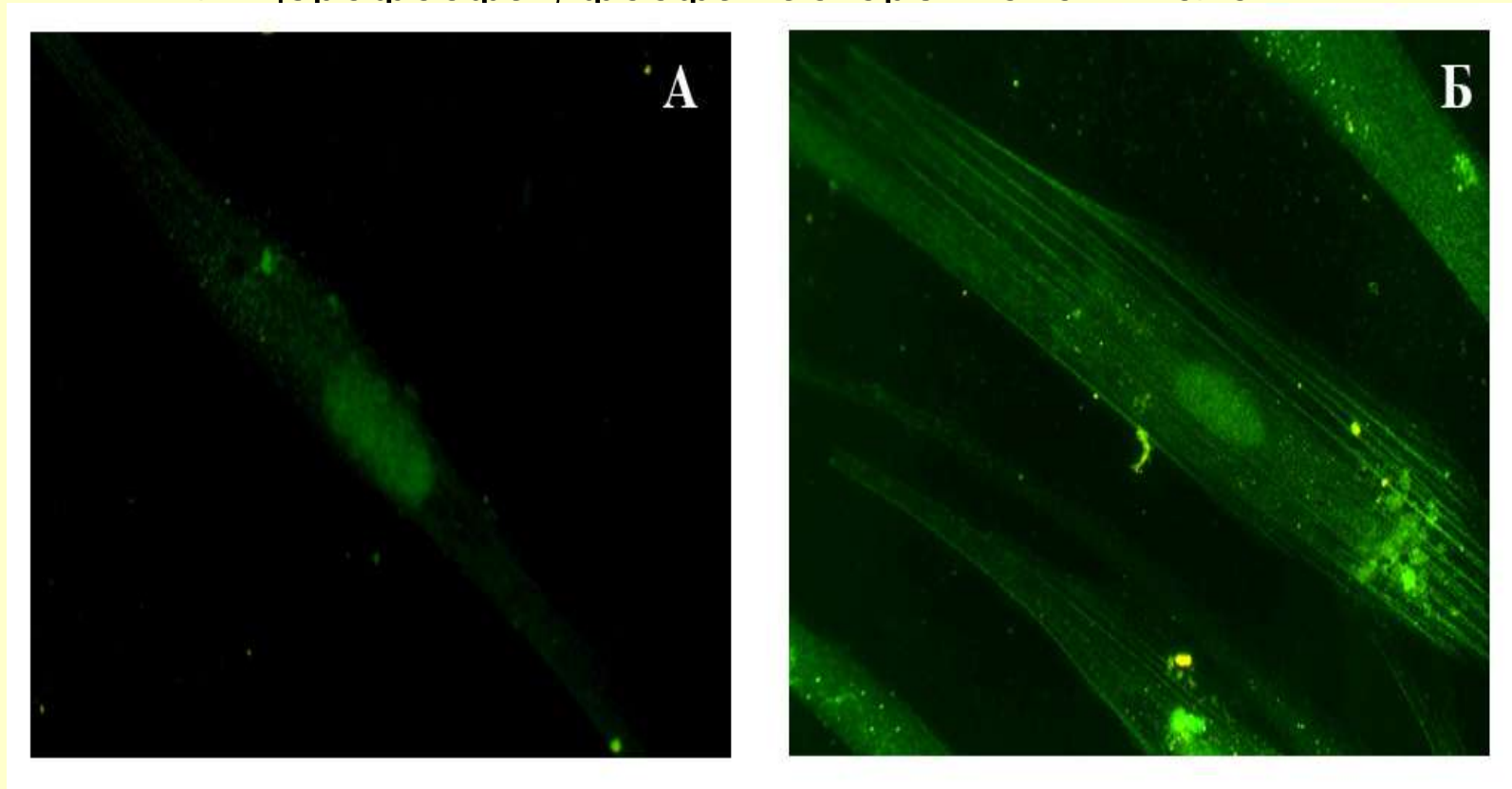


Окрашивание клеток, выделенных из амниона плаценты человека антителами к нестину (А) и Ki67 (Б).



# Дифференцировка клеток, полученных из плаценты человека, в остеоциты

Дифференцировочная среда: DMEM-F12, Дексаметазон,  $\beta$ -глицерофосфат, фосфат аскорбиновой кислоты



Окрашивание клеток, выделенных из амниона, антителами к остеонектину и культивируемых в стандартных условиях (А) и в дифференцировочной среде (Б).