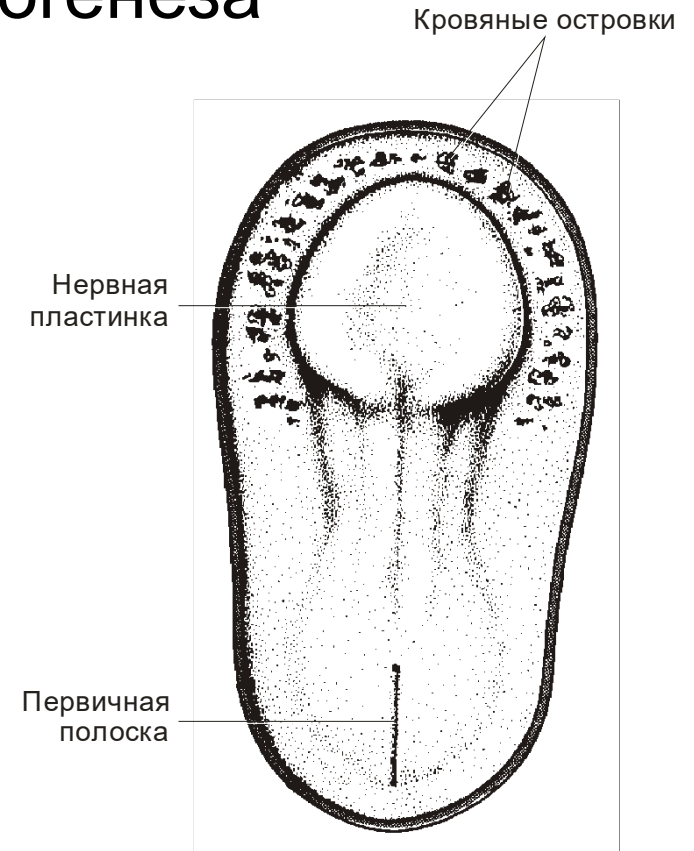
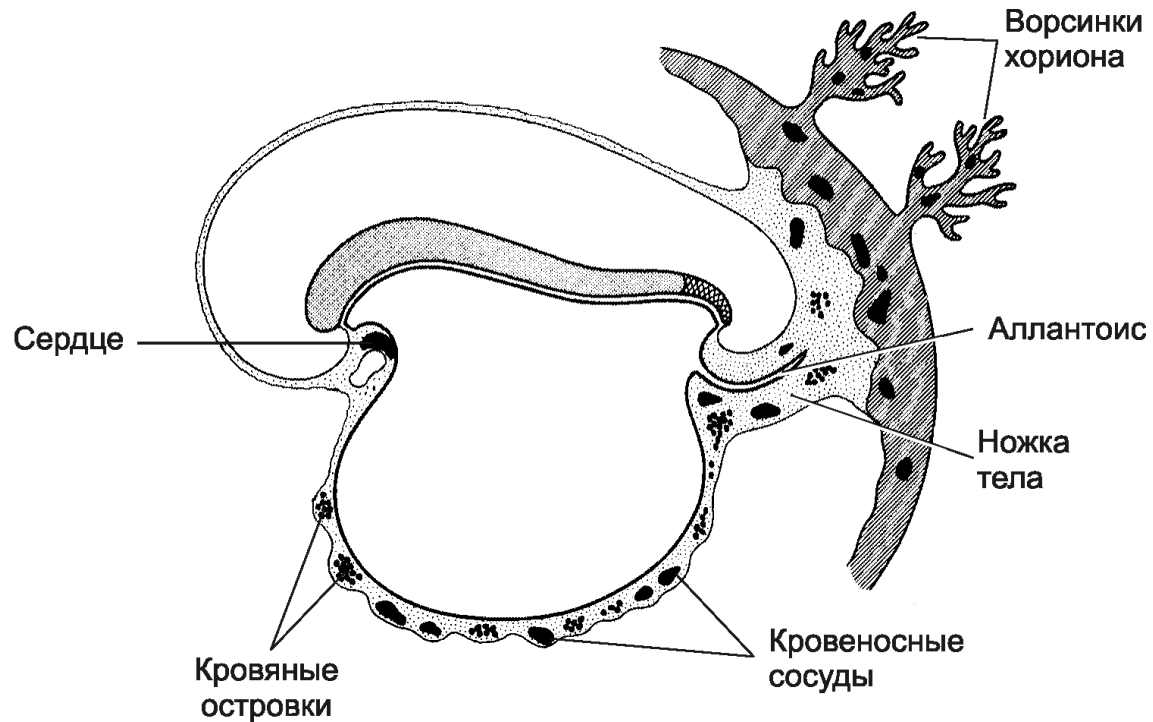


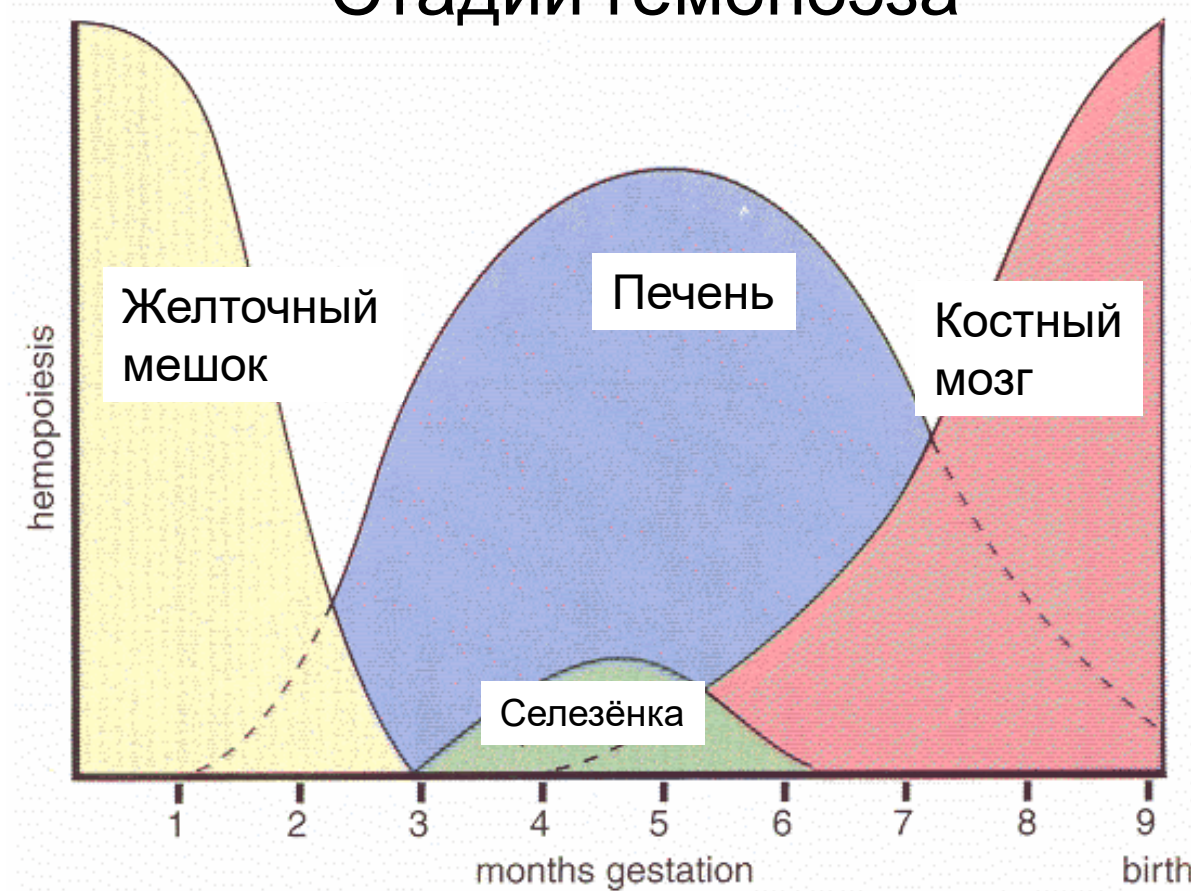
Гемопоз (кроветворение) —
образование клеток крови в
кроветворных органах

Гемопозз начинается на 3-й неделе эмбриогенеза



- Внезародышевая мезодерма обрастает энтодерму желточного мешка.
- Скопления мезенхимных клеток образуют кровяные островки.
- Общий для васкулогенеза и гемопоза предшественник гемангиобласт экспрессирует Flk-1 — рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF.
- Внутренняя клеточная масса → эпибласт → внезародышевая мезодерма → мезенхима → гемангиобласт.
- Клетки, расположенные по периферии островка, дифференцируются в эндотелиальные клетки первичных кровеносных сосудов.
- В центральной части островка образуются первые клетки крови — первичные эритробласты.

Стадии гемопоэза

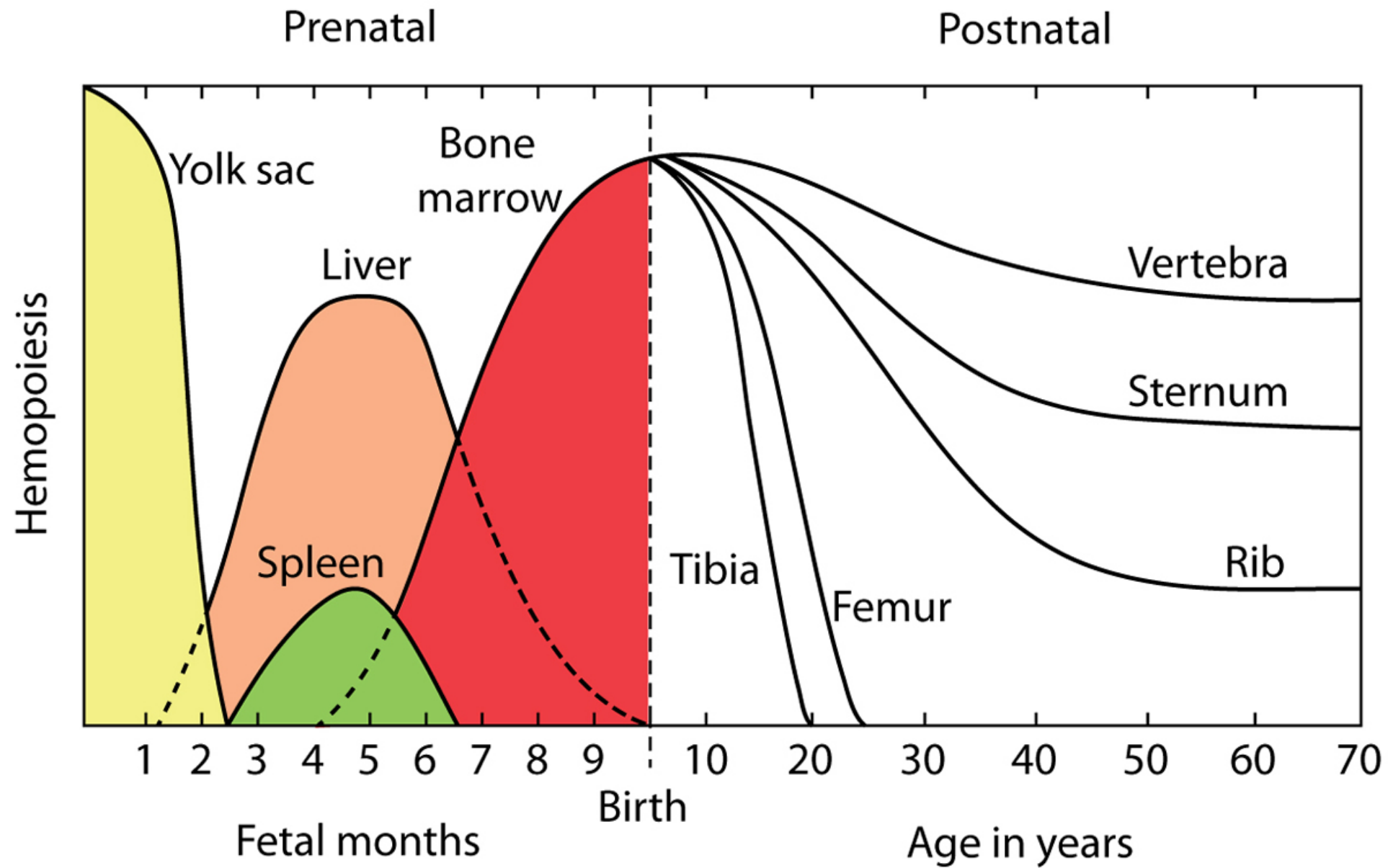


Пренатальный гемопоэз

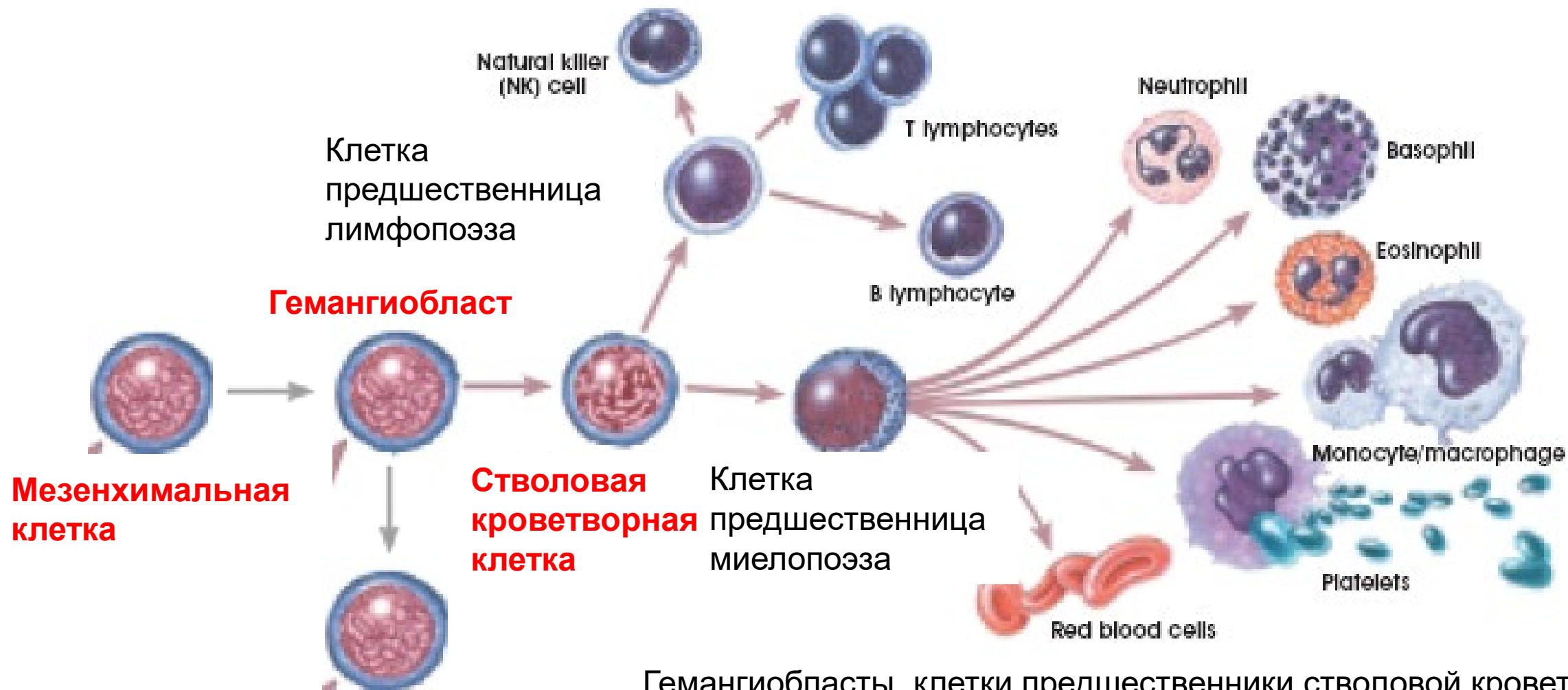
- Мезобластическая стадия (первичные эритробласты с ядром и эмбриональным гемоглобином) в желточном мешке.
- Гепатоспленотимическая стадия.
- Миелоидная (костномозговая) стадия.

Постнатальный гемопоэз

Когда костный мозг не в состоянии удовлетворить повышенный и длительный запрос на образование клеток крови, гемопоэтическая активность печени и селезёнки может восстановиться (экстрамедуллярный гемопоэз).



Гемангиобласт



Гемангиобласты, клетки предшественники стволовой кроветворной клетки и эндотелиальных клеток сосудов, дифференцируются из внезародышевой мезодермы. Морфоген *Ihh* (Indian hedgehog), VEGF, ретиноевая кислота секретируются клетками внезародышевой энтодермы и стимулируют дифференцировку гемангиобластов.

Красный костный мозг

Присутствует в:

позвонках, грудины, рёбрах, костях черепа, таза, эпифизах трубчатых костей.

Состоит из:

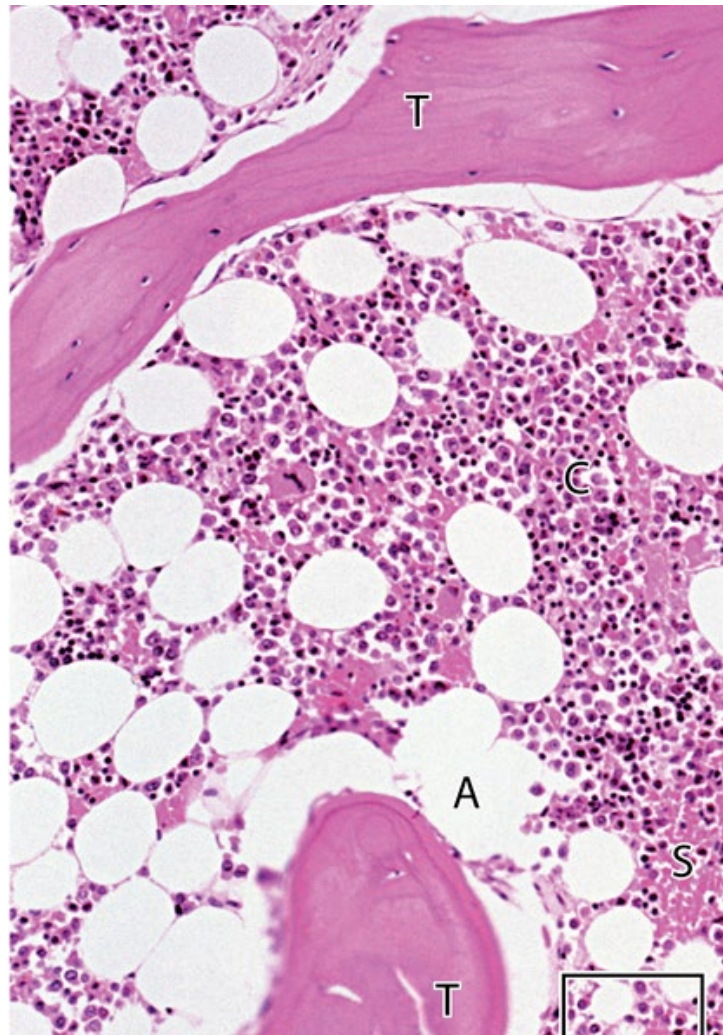
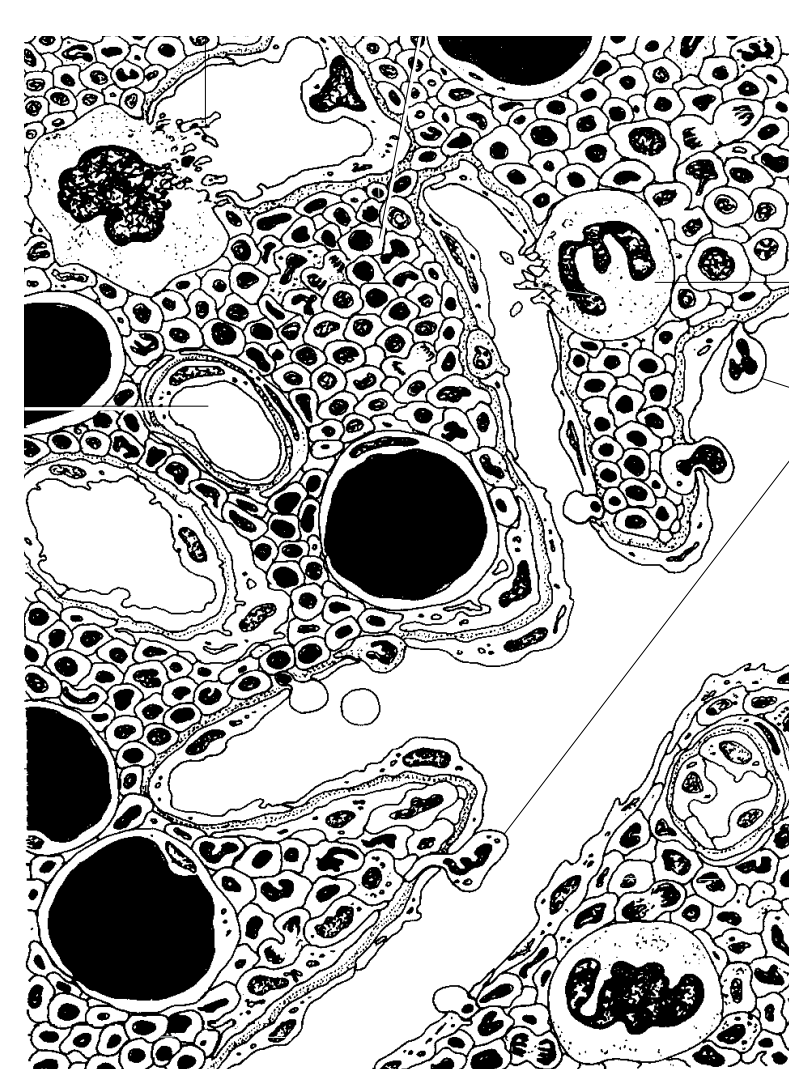
- стромы (1%);
- миелоидного ряда (гранулоциты, 65%);
- лимфоидного ряда (14%);
- эритроидного ряда (20%);
- миелоид:эритроид = 3:1 — 5:1.

Функции:

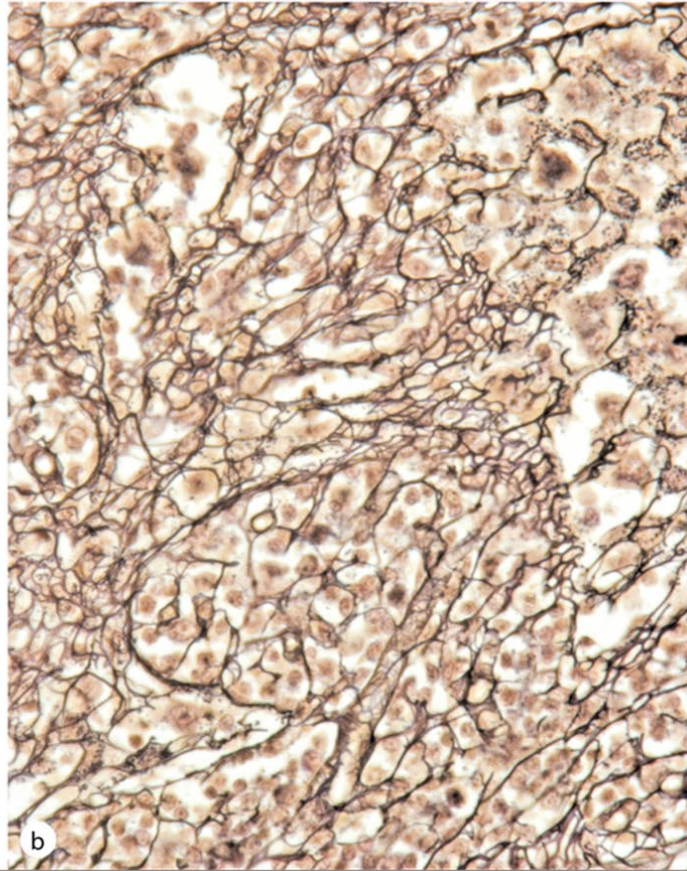
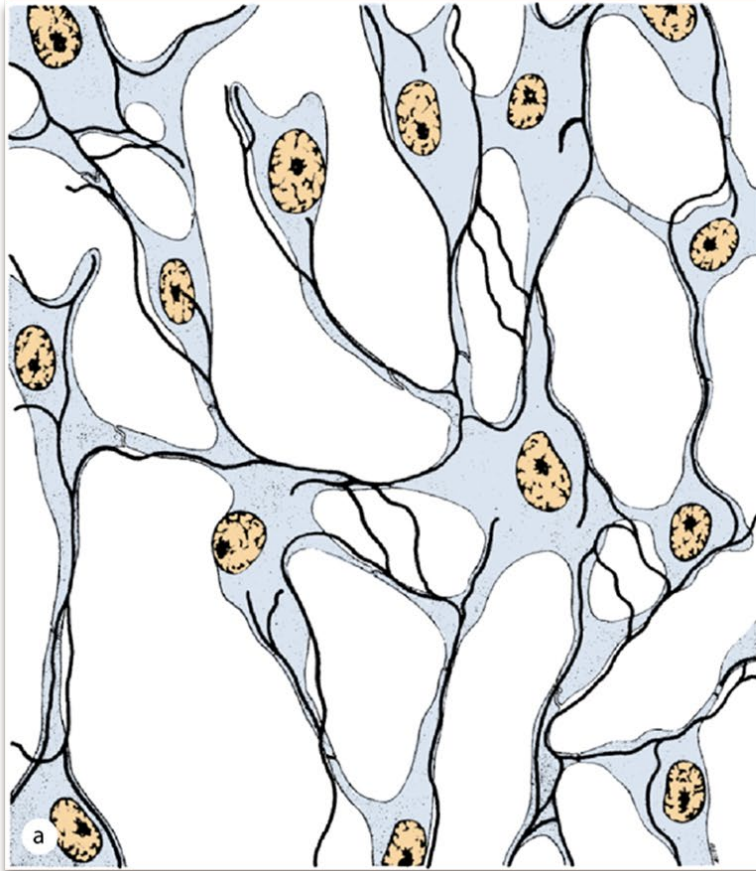
- кроветворение;
- удаление из кровотока старых и дефектных клеток крови (макрофаги);
- дифференцировка из В-лимфоцитов плазматических клеток, синтезирующих АТ.

Строма костного мозга включает:

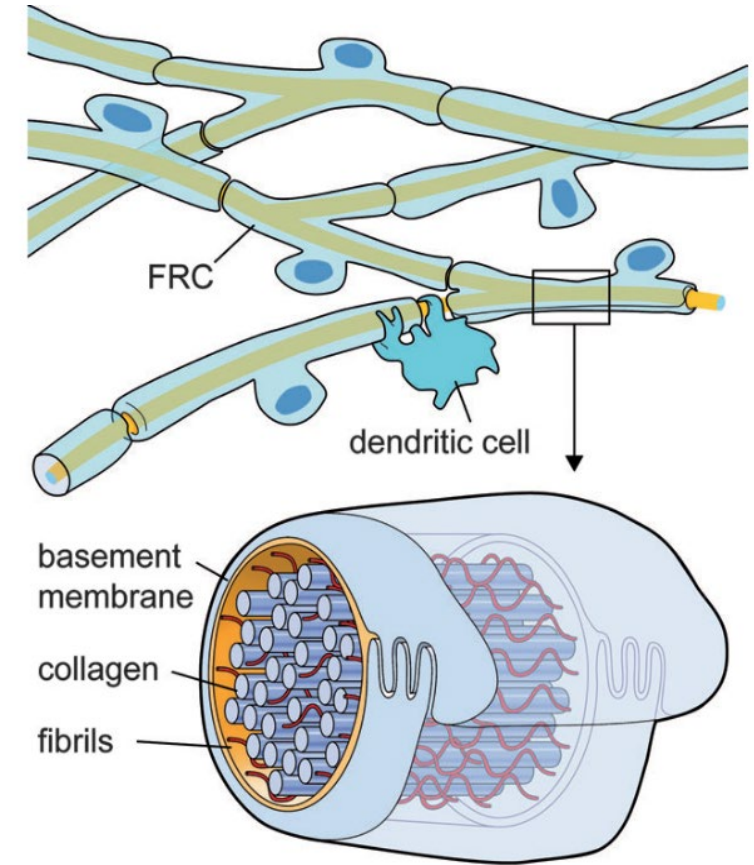
- ретикулярную ткань;
- синусоидные капилляры;
- макрофаги;
- жировые клетки (50% объёма).



Ретикулярная ткань

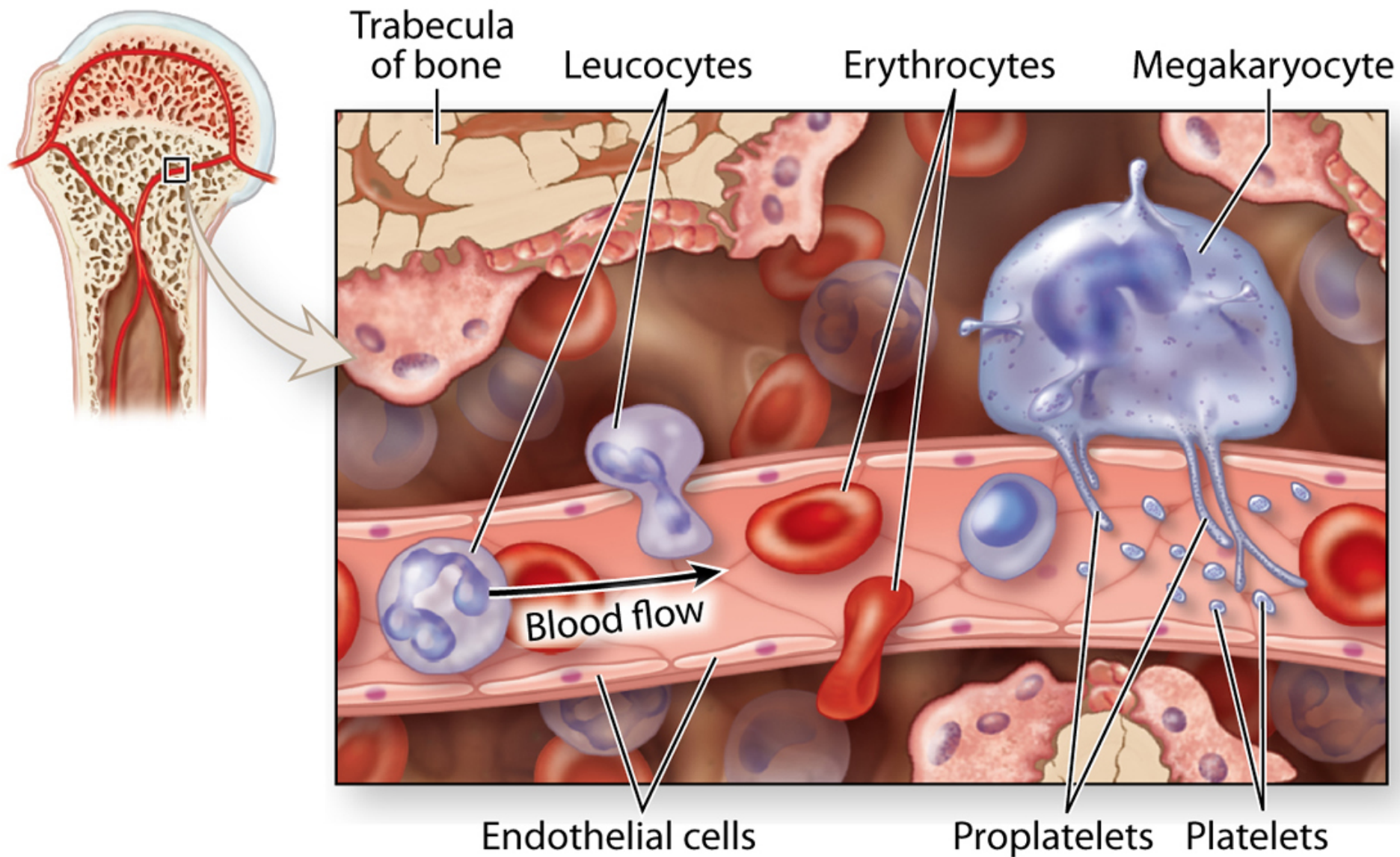


Fibroblastic reticular cells, FRC



Трёхмерная сеть (ретикулярные клетки и ретикулиновые волокна из коллагена III типа) образует строму красного костного мозга, селезёнки, лимфатических узлов, окружает синусоиды (капилляры) печени.

Ниша для гемопоэтических и иммунокомпетентных клеток. Ретикулярные клетки секретируют различные гемопоэтические факторы роста (ИЛ3, ИЛ7, SCF, GM-CSF, G-CSF, M-CSF), обеспечивающие специфическое микроокружение для развивающихся клеток крови.

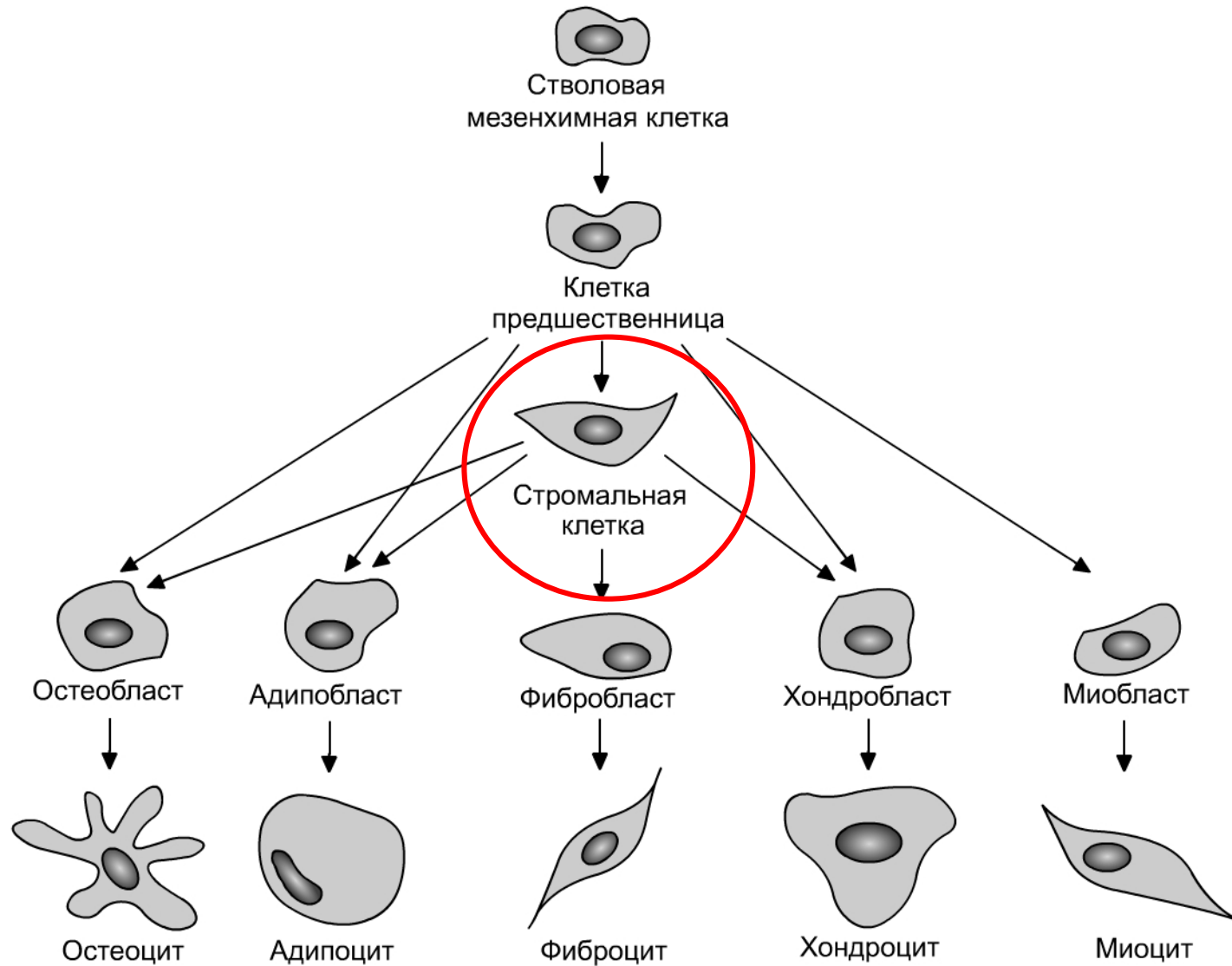


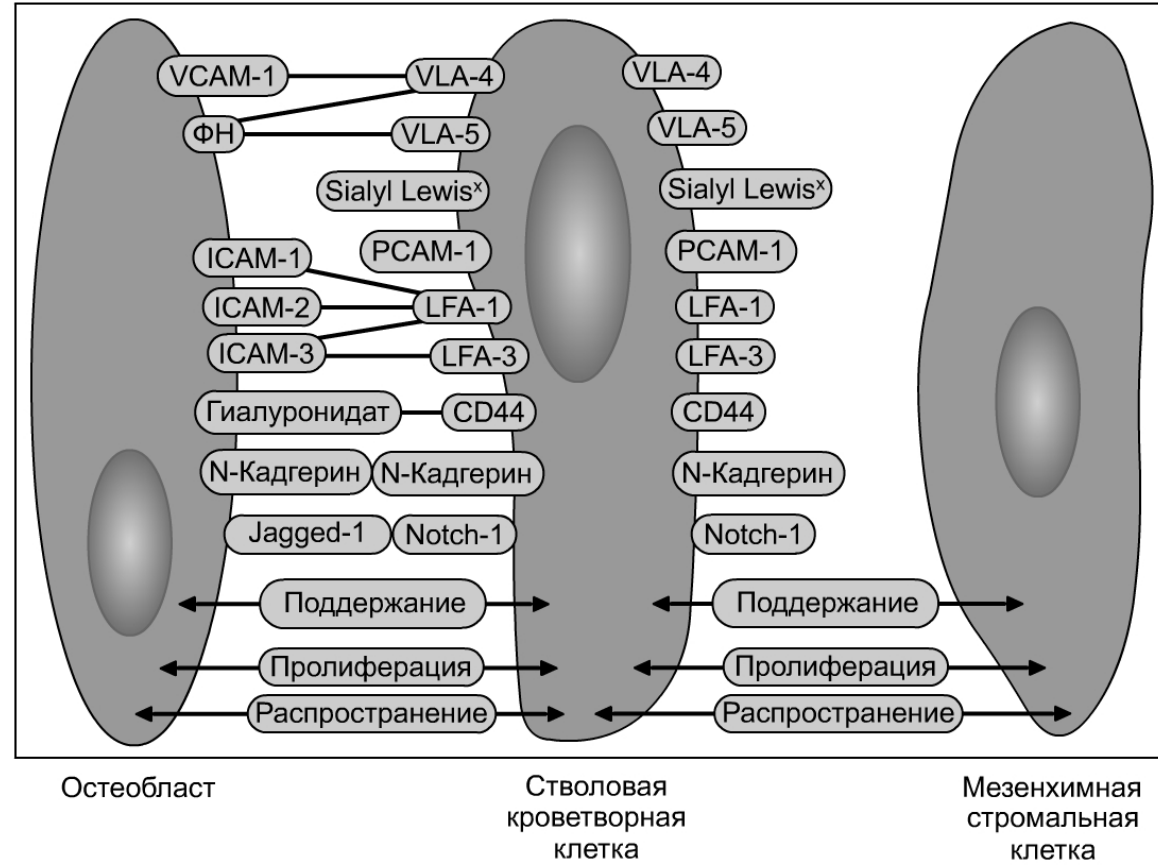
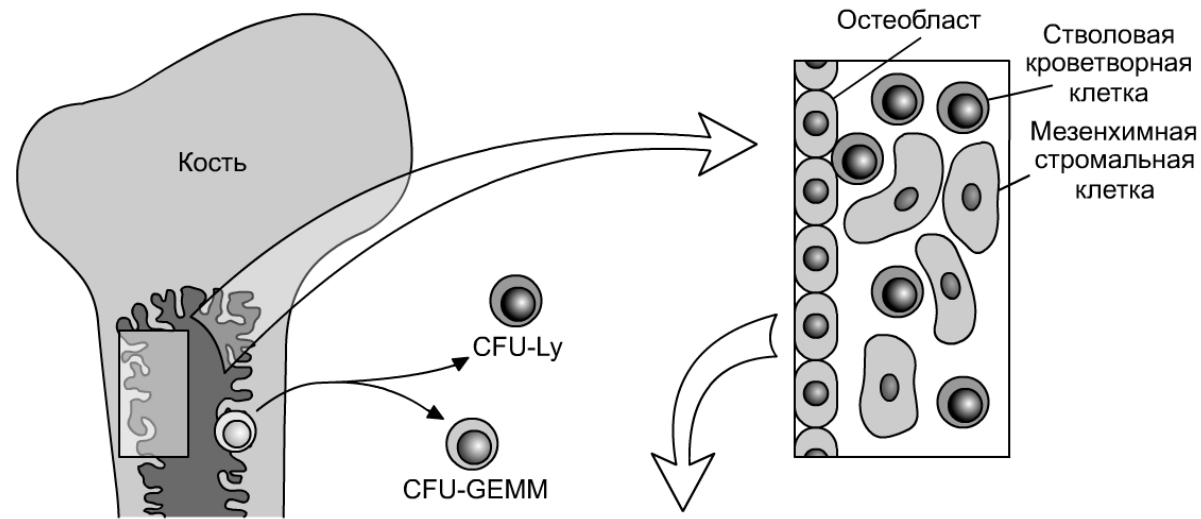
Жёлтый костный мозг. У взрослых большая часть костного мозга становится неактивной; в нём преобладают жировые клетки. Жёлтый костный мозг, однако, может восстановить свою активность, если необходимо усилить гемопоэз (например, при хронической гипоксии или выраженных кровотечениях).

Стволовая кроветворная клетка

- CFU-blast (CFU — **C**olony **F**orming **U**nit, колониеобразующая единица)
- маркеры: CD34, CD31, CD59, Sca1, Thy1, OCT4, NANOG, SOX2, FGF4
- морфологически сходна с малым лимфоцитом, способна к дифференцировке во все клетки крови
- может выходить в кровоток
- постоянно, но редко делится, причём с относительно неизменной частотой (т.е. нечувствительна к запросу)
- при делении стволовой кроветворной клетки дочерние клетки выбирают симметричное или асимметричное деление (остаются стволовыми кроветворными клетками, или дифференцируются в полипотентные потомки)
- дочерние клетки дифференцируются в пролиферирующие полипотентные клетки-предшественницы (колониеобразующие единицы) лимфоцитопоза (CFU-Ly) и миелопоэза (CFU-GEMM)
- остеобласт взаимодействует со стволовой кроветворной клеткой и вместе со стромальной [мезенхимальной] клеткой костного мозга участвует в создании ниши стволовой кроветворной клетки. Остеобласты продуцируют многочисленные факторы, контролирующие выживание, пролиферацию и созревание стволовой кроветворной клетки.

Мезенхимальная стромальная клетка





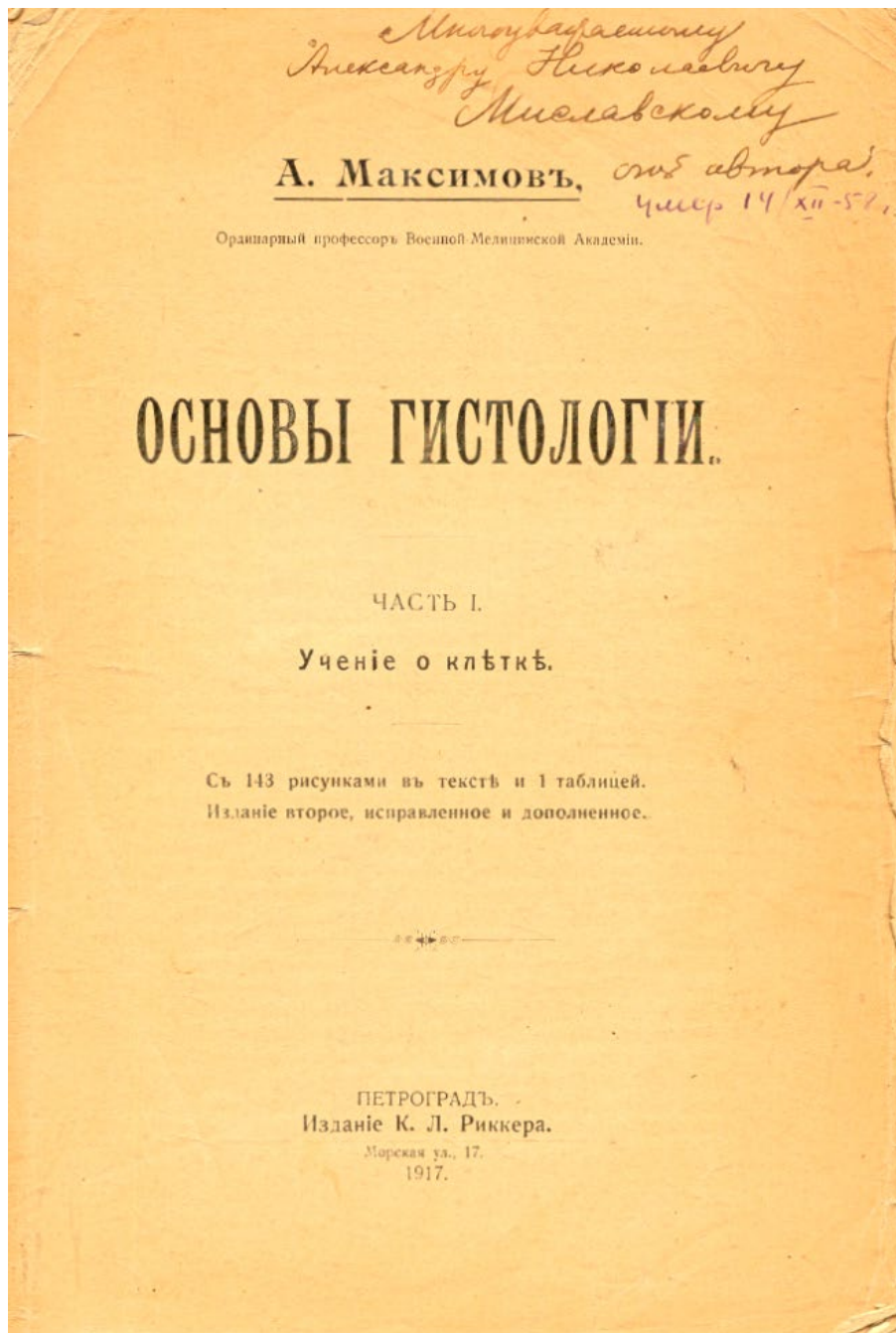


Максимов Александр Александрович (1874—1928) — доктор медицины, профессор кафедры гистологии и эмбриологии Императорской военно-медицинской академии, Санкт-Петербург.

Впервые термин «стволовая клетка» был предложен в 1909 году на заседании гематологов в Берлине. Максимов А.А. выдвинул положение о стволовой клетке крови во взрослом организме.

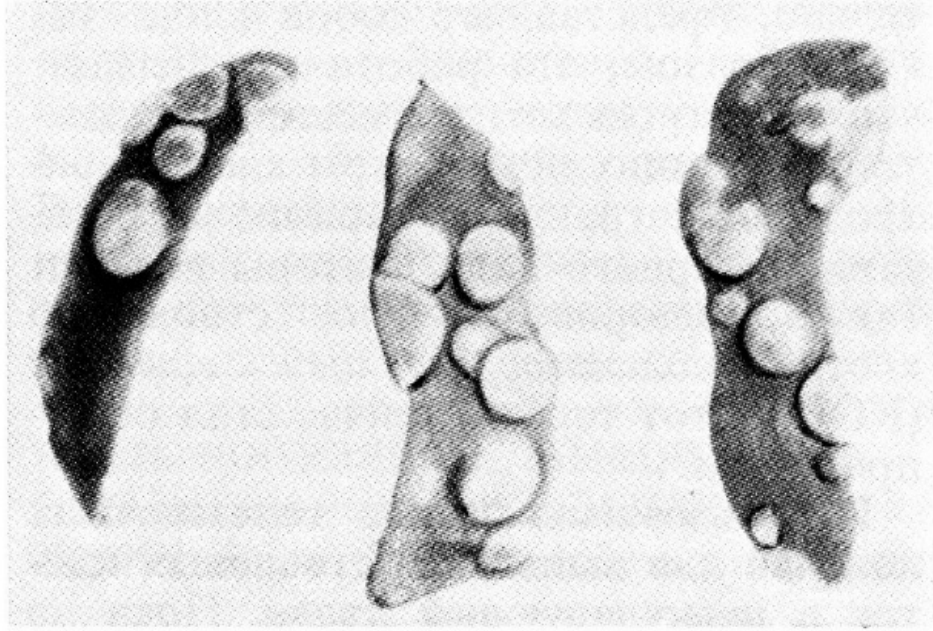
Только в 1961 году канадские ученые Джеймс Тилл и Эрнест Мак-Каллох экспериментально доказали существование стволовой клетки крови.

В 2006 году Синъя Яманака (Нобелевская премия 2012) получил стволовую клетку *in vitro* путем перепрограммирования соматической зрелой клетки.



Александр Николаевич Миславский (1880–1958)

Открытие колониобразующей единицы



Till, McCulloch, 1961.

Селезеночные колонии через 10 дней после введения клеток красного костного мозга летально облучённым мышам.

После создания атомной бомбы усиленно изучаются действия радиации на организм.

При летальном облучении первыми страдают ткани, в которых происходит быстрое обновление (например, красный костный мозг)

Джеймс Тилл (J. Till) и Эрнест Мак-Каллох (E. McCulloch) облучали мышей-реципиентов в летальной дозе, после чего трансплантировали им клетки красного костного мозга от животного-донора той же линии. В результате мыши выживали, а в их селезенке были обнаружены узелки (очаги кроветворения), состоящие из скопления клеток эритроидного и гранулоцитарного ряда

Тилл и МакКаллох предположили, что каждый очаг кроветворения представляет собой клеточную колонию (клон клеток), происходящую из одной донорской клетки — колониобразующей единицы (КОЕ).

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012

Sir John B. Gurdon, Shinya Yamanaka

"for the discovery that mature cells can be reprogrammed to become pluripotent"



В 60-е годы XX в. Джон Гердон в облучённое яйцо лягушки трансплантировал ядро клетки кишечника. 1% таких яиц развивался во взрослых лягушек.



В 2006 г. получил индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (induced Pluripotent Stem cells - iPS) из соматической клетки.

Индукцированные плюрипотентные клетки (induced Pluripotent Stem cells, iPS-cell) получены путём генетической модификации фибробластов мыши факторами транскрипции Oct4, Sox2, cMyc и Klf4 (коктейль Яманаки). Полученные клетки обладают свойствами эмбриональных стволовых клеток. В культуре iPS-клетки спонтанно дифференцируются в производные зародышевой эктодермы, энтодермы и мезодермы. В результате трансплантации iPS-клеток в бластоцисту мыши получены живые химеры, способные генерировать половые клетки iPS происхождения.

Экспрессия Oct-4 (Octamer binding gene) в клетках внутренней клеточной массы и эпибласта **поддерживает пролиферацию и препятствует дифференцировке клеток**. При этом в трофобласте и образовавшихся во время гаструляции первичных зародышевых листках Oct-4 функционально не активен. Oct-4 считается надёжным маркёром эмбриональных стволовых клеток.

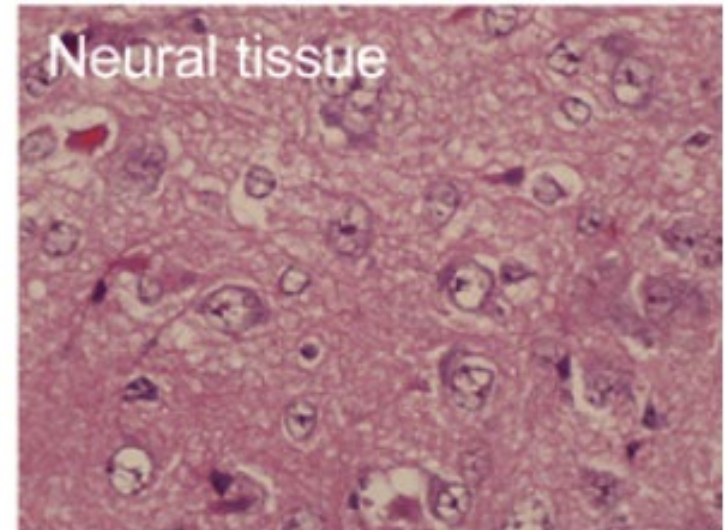
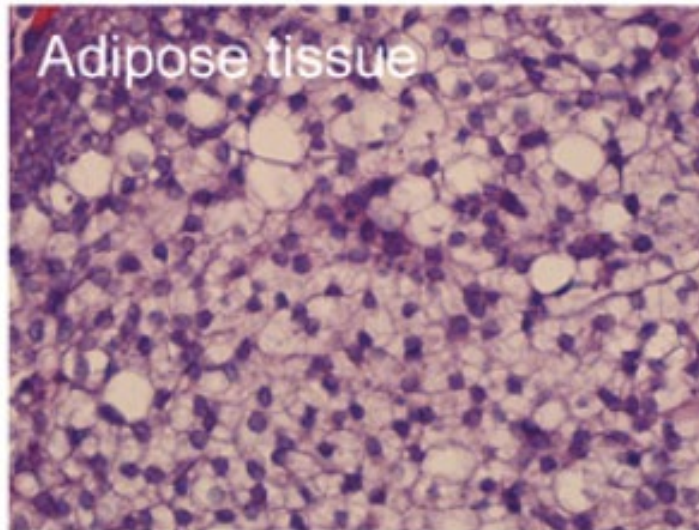
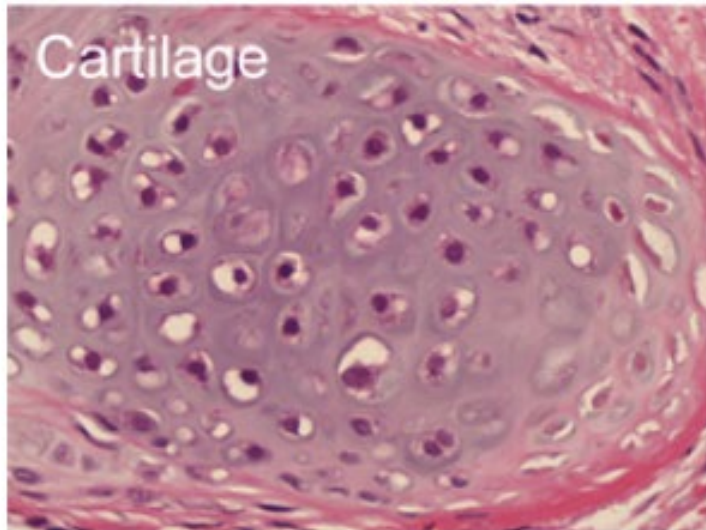
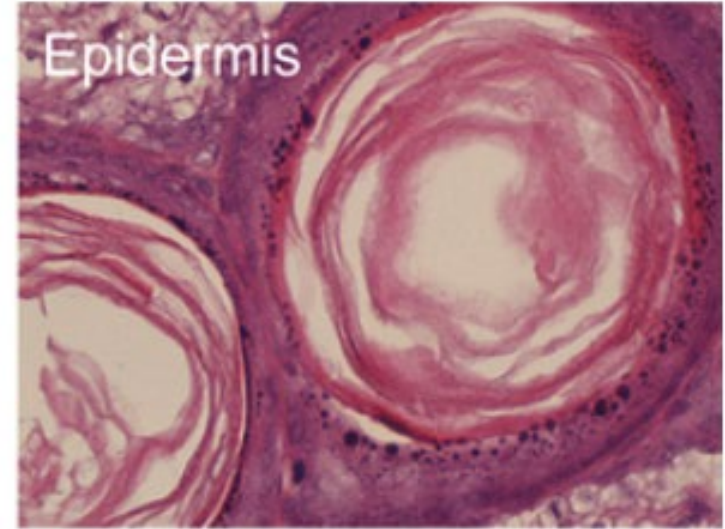
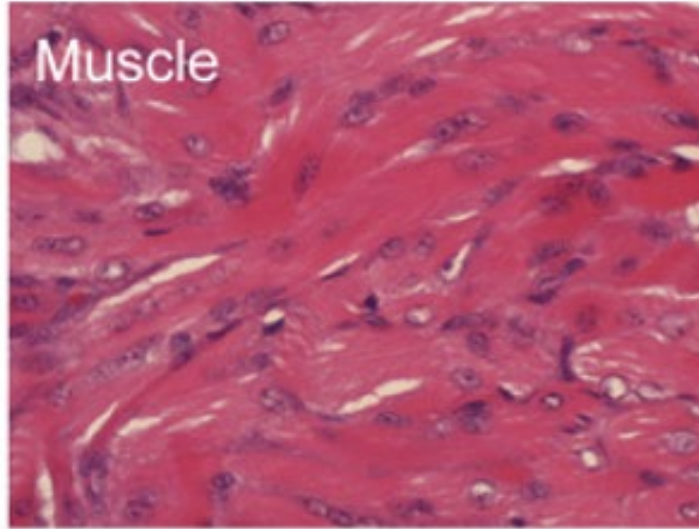
Sox2 (сложное сокращение от 'SRY-related HMG-box gene 2') также является транскрипционным фактором, играющим **важную роль в пролиферации** эмбриональных стволовых клеток.

cMyc является транскрипционным фактором, который регулирует экспрессию большого количества генов путем взаимодействия с Е-боксами (Enhancer Box sequences, E-boxes) и связывания белка НАТ (ацетилтрансфераза гистонов). Повышенная экспрессия **cMyc приводит к клеточной пролиферации**.

Klf4 (Krüppel-like factor 4) является транскрипционным фактором, который играет роль **в регуляции дифференцировки** клеток.

Факторы синергично усиливают экспрессию “stemness” генов и подавляют экспрессию генов дифференцировки.

Тератома из iPS-клеток человека после однократной подкожной инъекции иммунодефицитным мышам

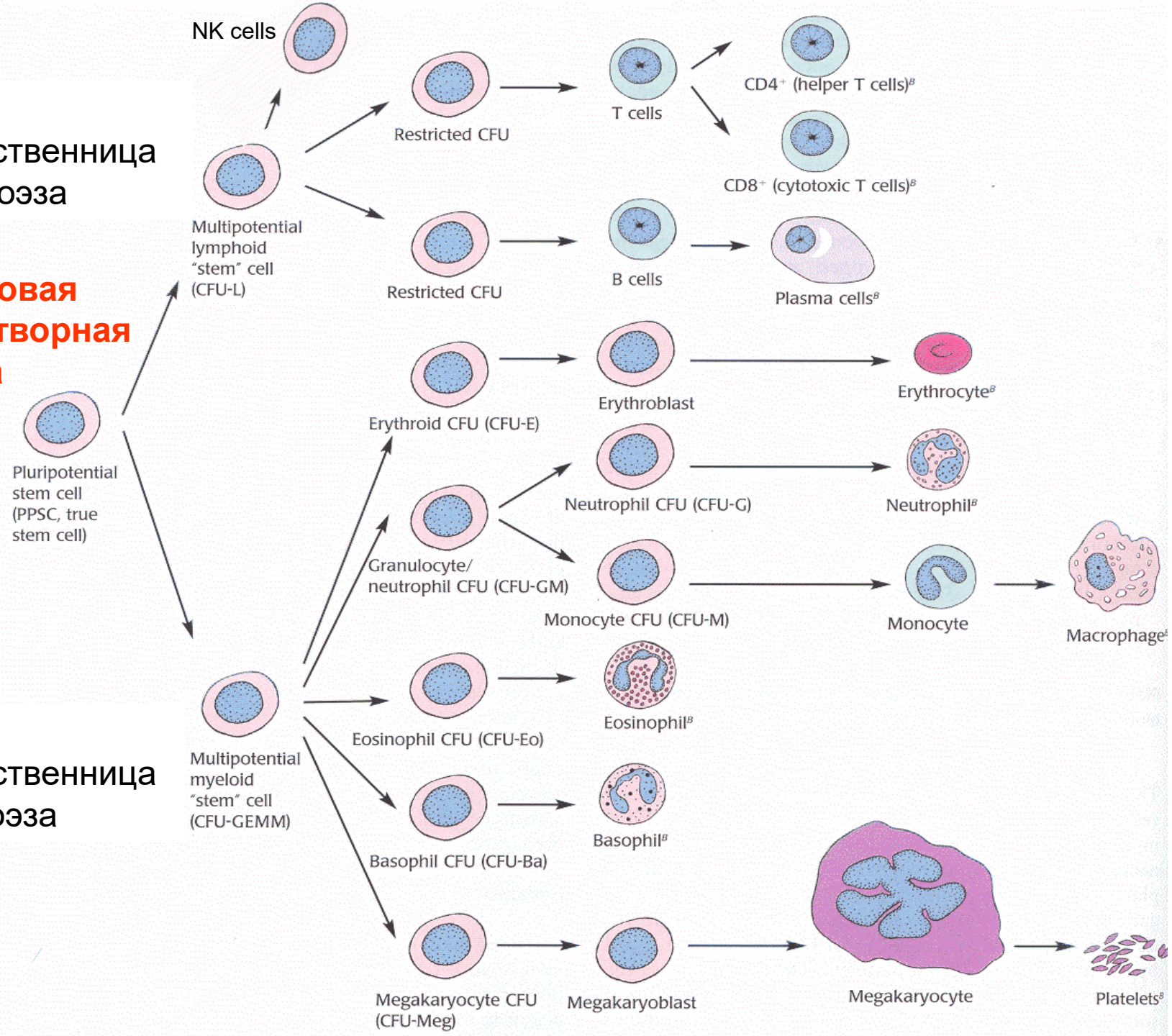


Dimos et al. генерировали iPS-клетки из ткани 82-х летней женщины с диагнозом бокового амиотрофического склероза [Dimos J.T., Rodolfa K.T., Niakan K.K., et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. **Science**. 2008; 321[5893]: 1218-21.]. Полученные iPS-клетки имели свойства эмбриональных стволовых клеток и дифференцировались в холинергические нейроны.

Клетка
предшественница
лимфопоэза

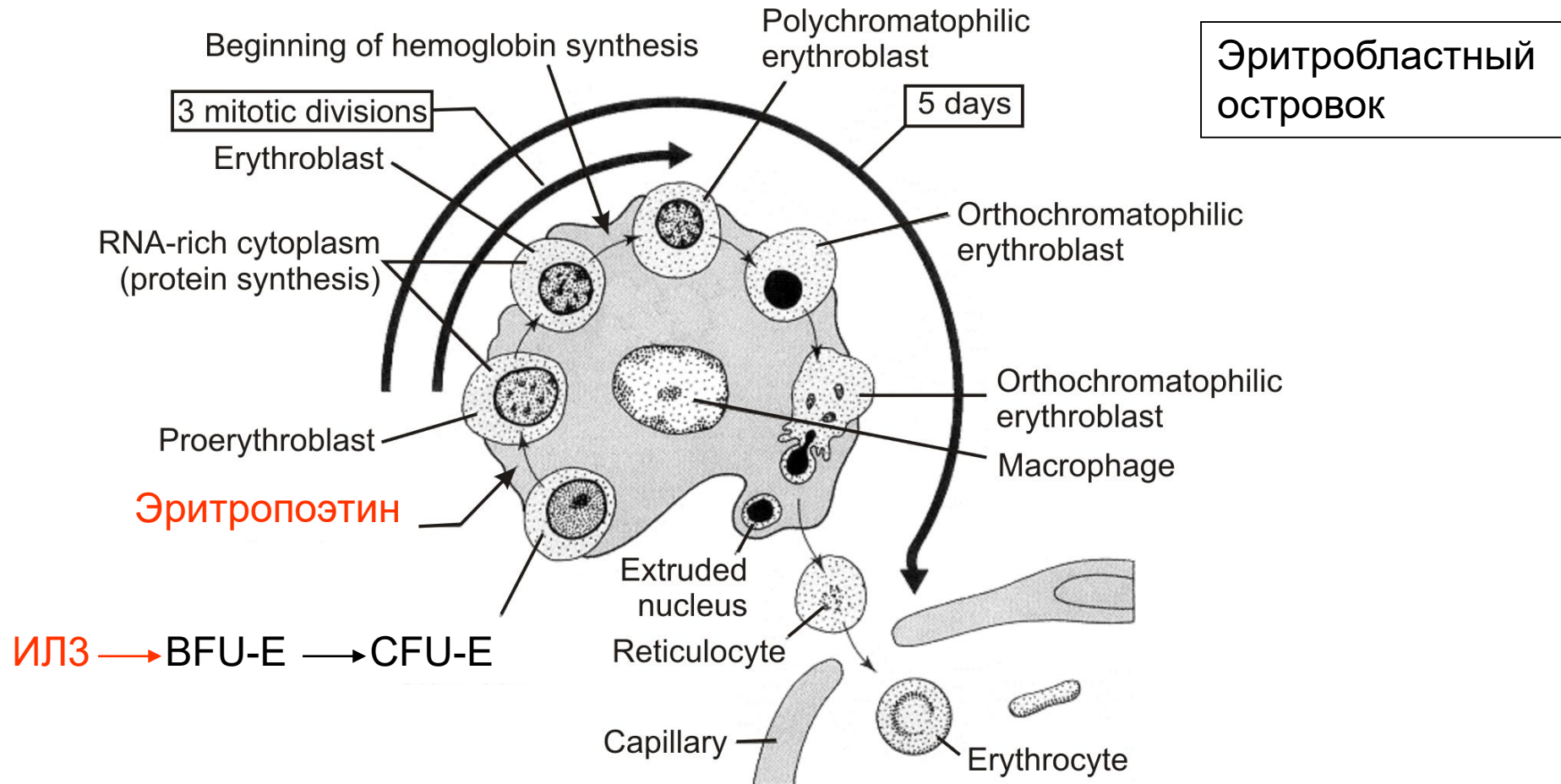
**Стволовая
кроветворная
клетка**

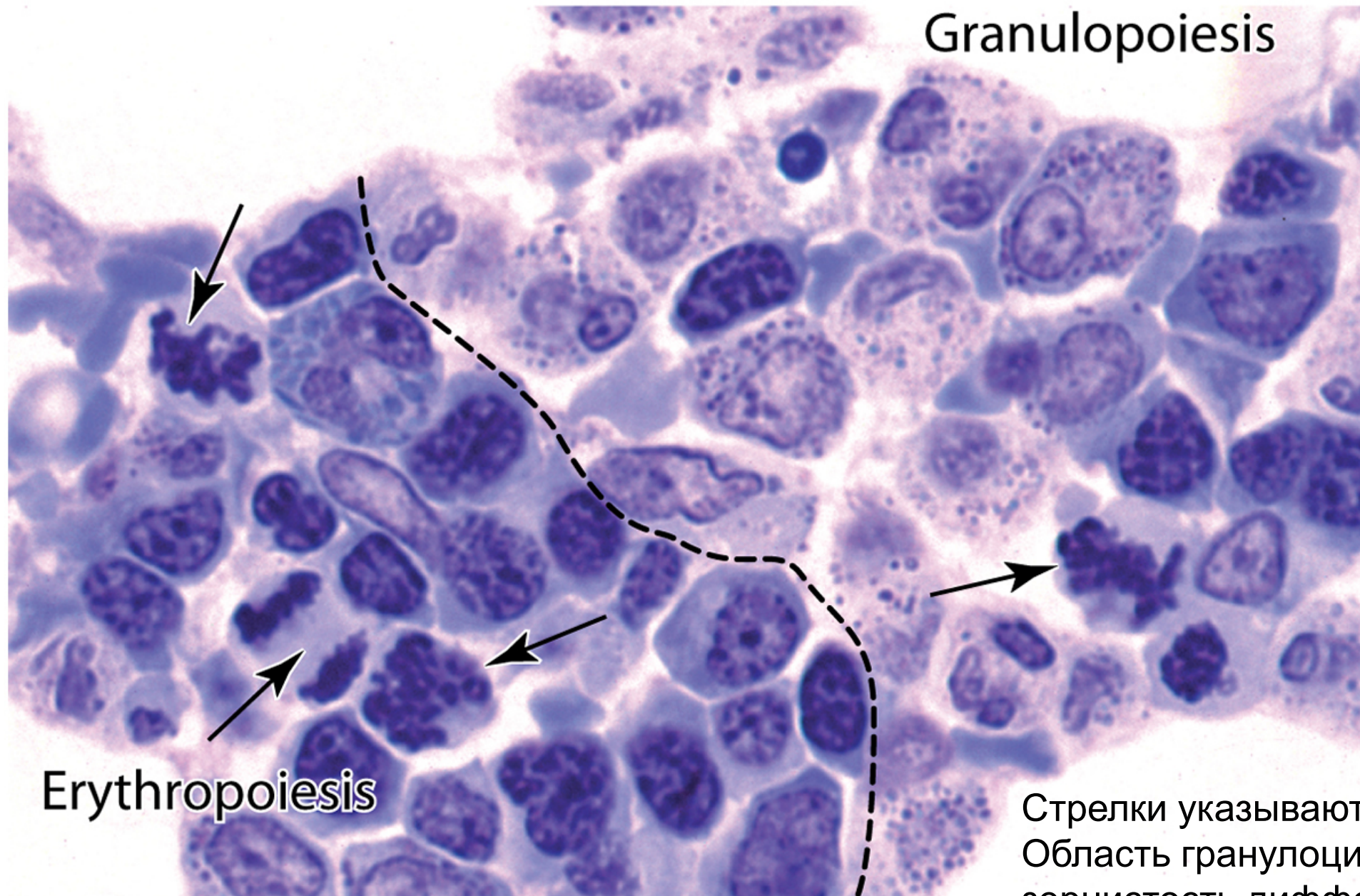
Клетка
предшественница
миелопоэза



Эритропоэз

CFU-blast → CFU-GEMM → BFU-E → CFU-E → проэритробласт → базофильный эритробласт → полихроматофильный эритробласт → оксифильный эритробласт (нормобласт) → ретикулоцит (1%) → эритроцит (длительность 2 недели)





Granulopoiesis

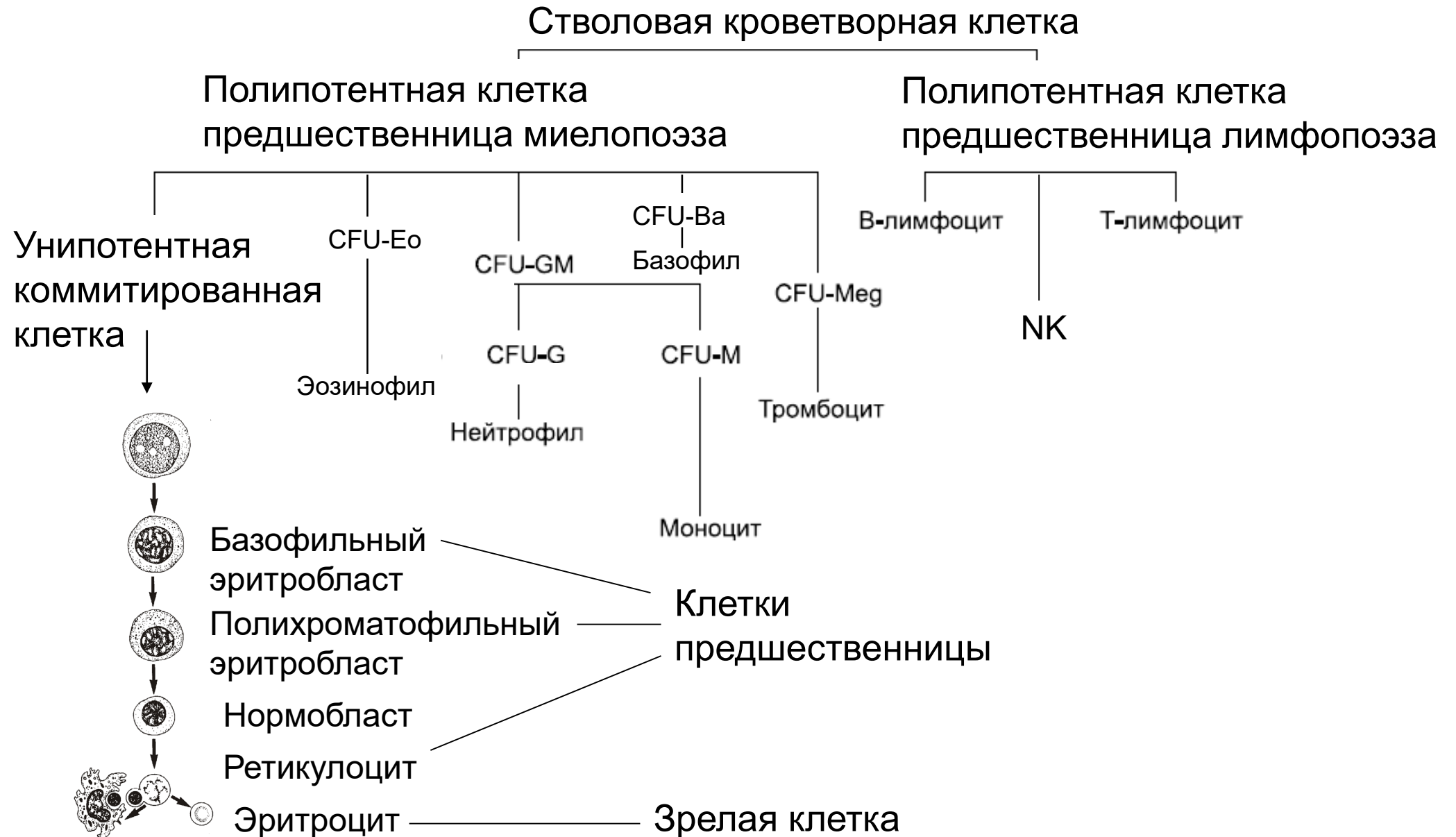
Erythropoiesis

Стрелки указывают на фигуры митоза.
Область гранулоцитопоза отличает
зернистость дифференцирующихся
клеток.

Оксифильный эритробласт (нормобласт) → ретикулоцит (1%) → эритроцит

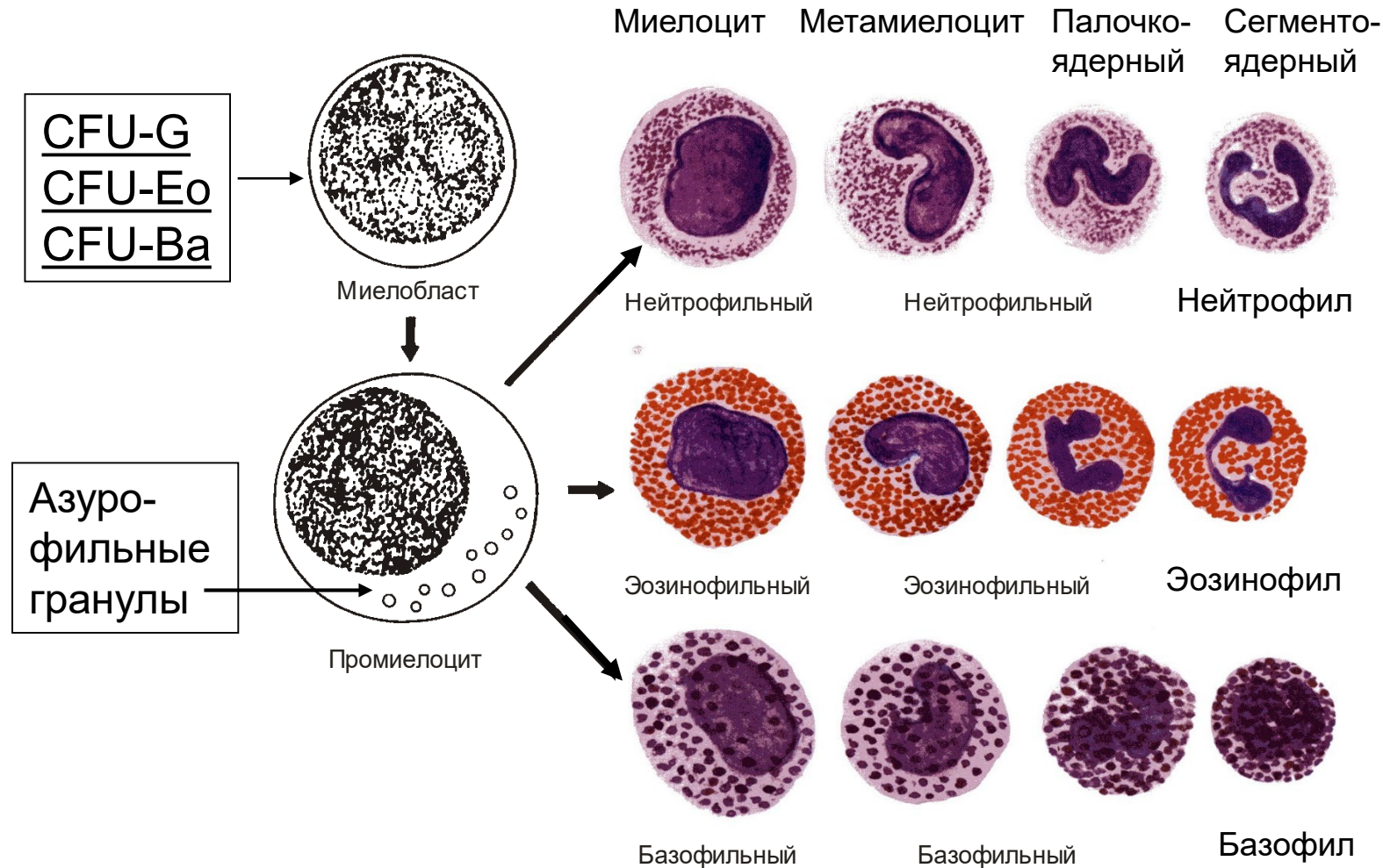


Гистогенетический ряд — стволовая клетка → полипотентная → унипотентная → клетки предшественницы → зрелая клетка

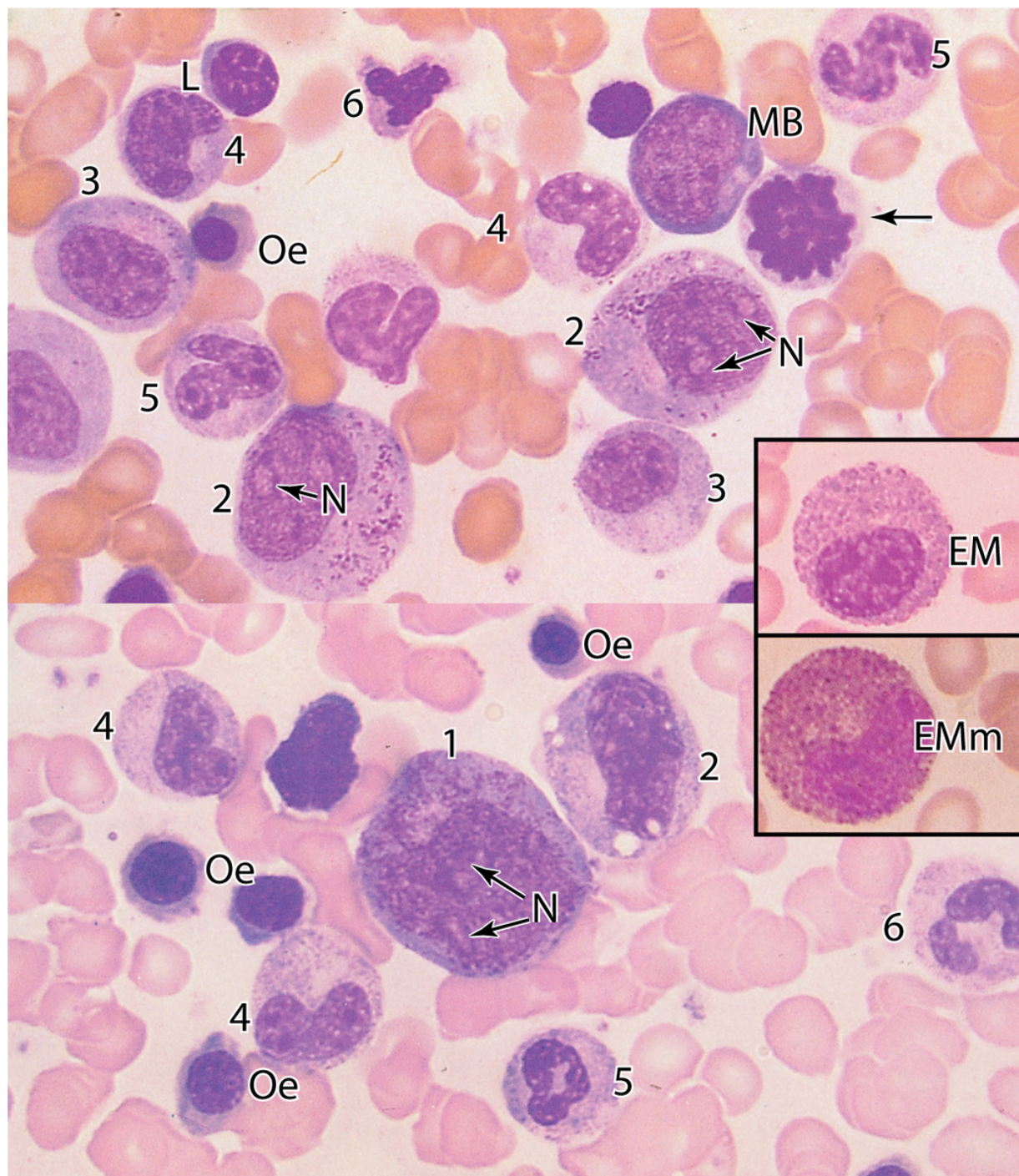


Гранулоцитопоэз

CFU-blast → CFU-GEMM → CFU-GM → CFU-G (нейтрофильных)



Сдвиг влево — увеличение относительного содержания палочкоядерных форм (N=3–5%) — возникает при выбросе в кровь незрелых форм нейтрофилов, что свидетельствует об усилении кроветворения вследствие потери крови или наличия очага острого воспаления.



Мазок костного мозга

Клетки-предшественники нейтрофильных гранулоцитов: миелобласт (MB); промиелоцит (1); миелоциты (2); поздний миелоцит (3); метамиелоциты (4); палочкоядерные клетки (5); зрелые сегментированные нейтрофилы (6). На некоторых ранних стадиях видны ядрышки (N).

Эозинофильные миелоциты (ЕМ) и метамиелоциты (ЕМm), специфические гранулы которых имеют отчетливо различное окрашивание. Эти клетки и клетки базофильной линии похожи на развивающиеся нейтрофилы, за исключением специфически окрашенных гранул.

Среди эритроцитов в этих мазках костного мозга также видны оксифильные эритробласты (Oe), небольшой лимфоцит (L) и клетка в митозе (стрелка).

Bone marrow

Mitosis:

Stem cell
Myeloblast
Promyelocyte
Myelocyte

Maturation:

Metamyelocyte
Band cell
Mature granulocyte

Storage

Blood

Marginating
cells

Circulating
cells

Пулы нейтрофилов

Резерв нейтрофилов в красном костном мозге действует как буферная система, способная высвобождать большое количество зрелых нейтрофилов по мере необходимости.

За пределами костного мозга гранулоциты могут находиться как в свободно циркулирующем пуле, так и в пуле пограничных клеток, временно прилипающих к эндотелиальным клеткам преимущественно в венах.

После адгезии гранулоциты могут мигрировать в ткани или снова попасть в циркуляцию.

Зрелые клетки попадают в циркуляцию, как правило, на короткий период, прежде чем мигрировать в ткани и остаются в тканевом пуле лишь на короткое время (менее 10 часов), ограниченное их активной функцией.

Моноцитопоз

CFU- blast → CFU-GEMM → CFU-GM → CFU-M → монобласт → промоноцит → моноцит

В течение 1–2 суток моноциты находятся в кровотоке, а затем мигрируют в ткани, где дифференцируются в макрофаги, совокупность которых (вместе с моноцитами) составляет систему **моноклеарных фагоцитов**.

Макрофаги. Дифференцировку моноцитов в CD64⁺-макрофаги стимулируют M-CSF и ИЛ6.

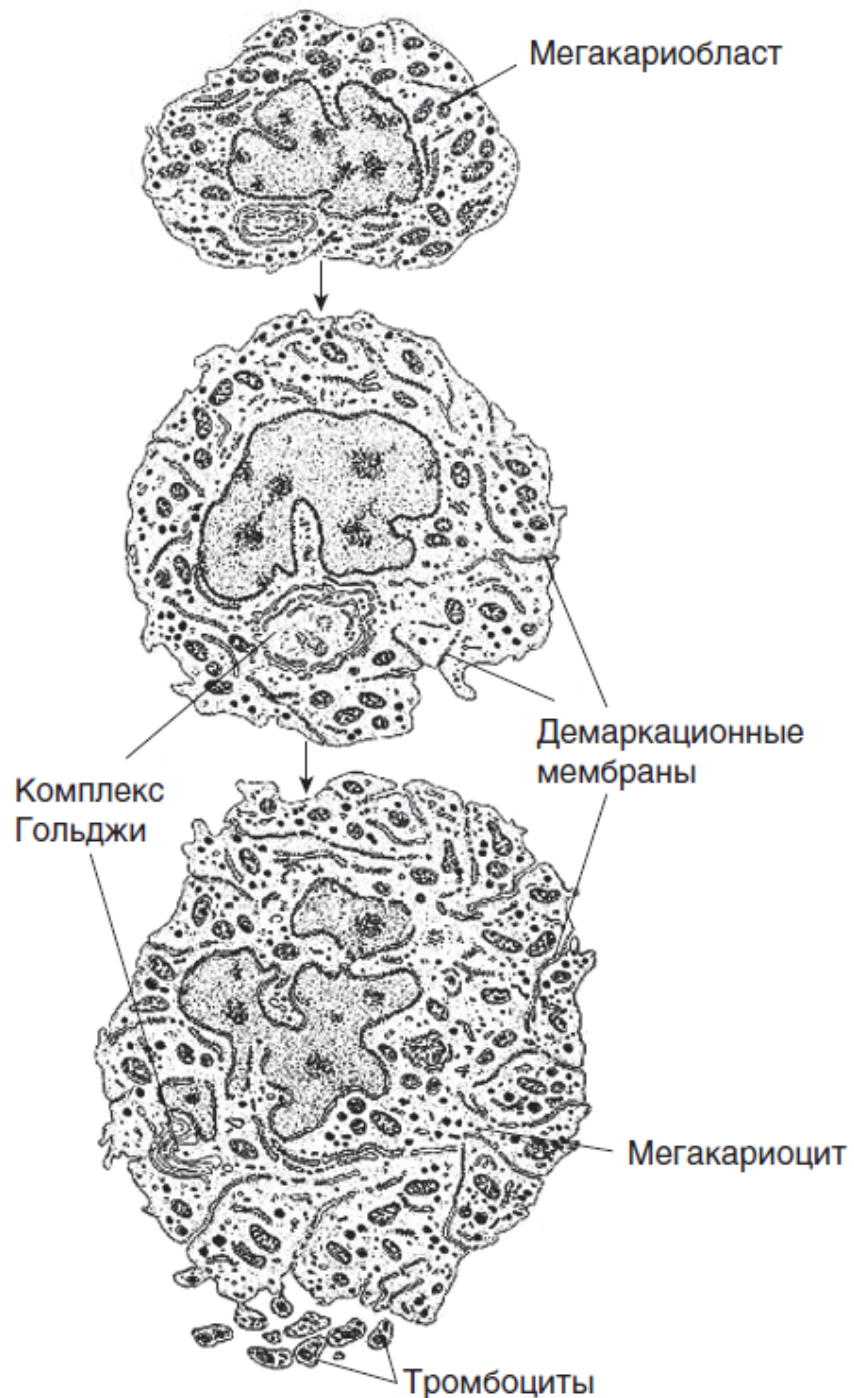
- Гистиоциты
- Перитонеальные макрофаги
- Альвеолярные макрофаги
- Остеокласты
- Клетки *фон Купфера*
- Клетки *Хофбауэра*
- Клетки микроглии ЦНС

Дендритные клетки могут дифференцироваться из моноцитов при антигенной стимуляции и действии цитокинов.

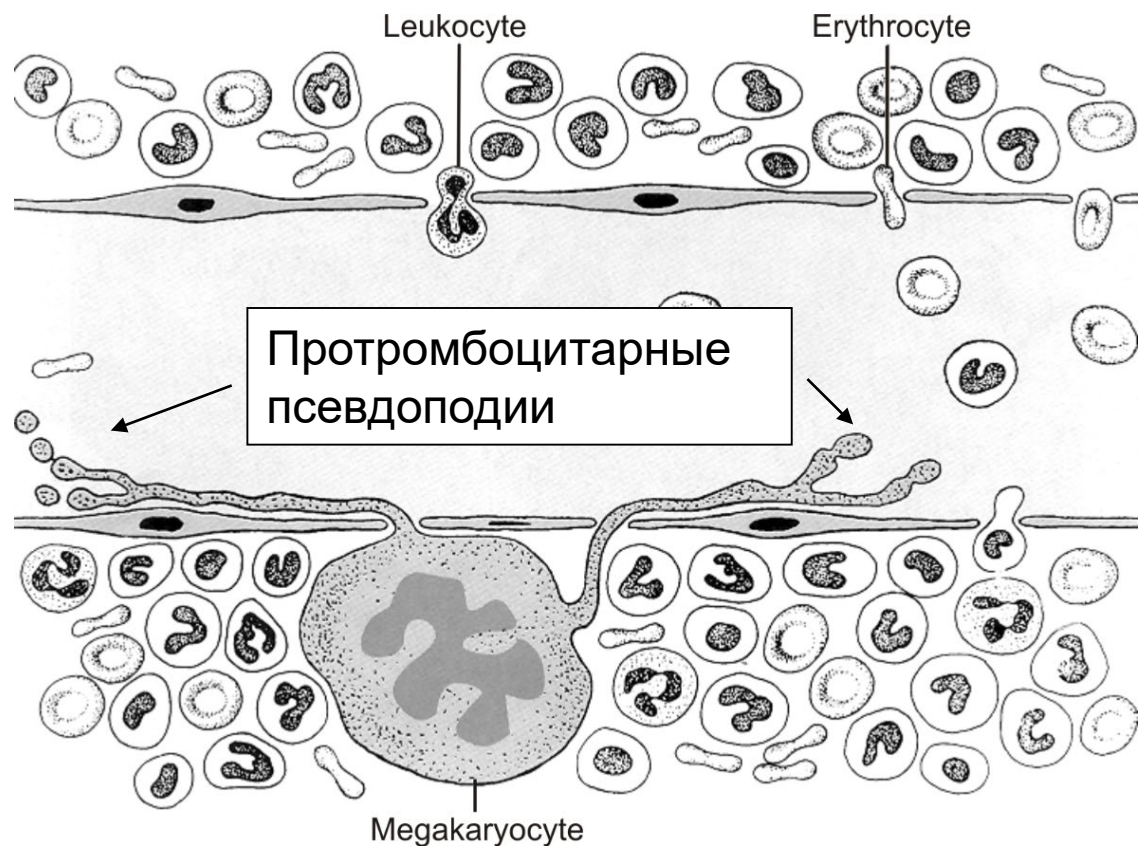
Тромбоцитопоэз

CFU-blast → CFU-GEMM → CFU-Meg →
мегакариобласт → мегакариоцит → тромбоциты

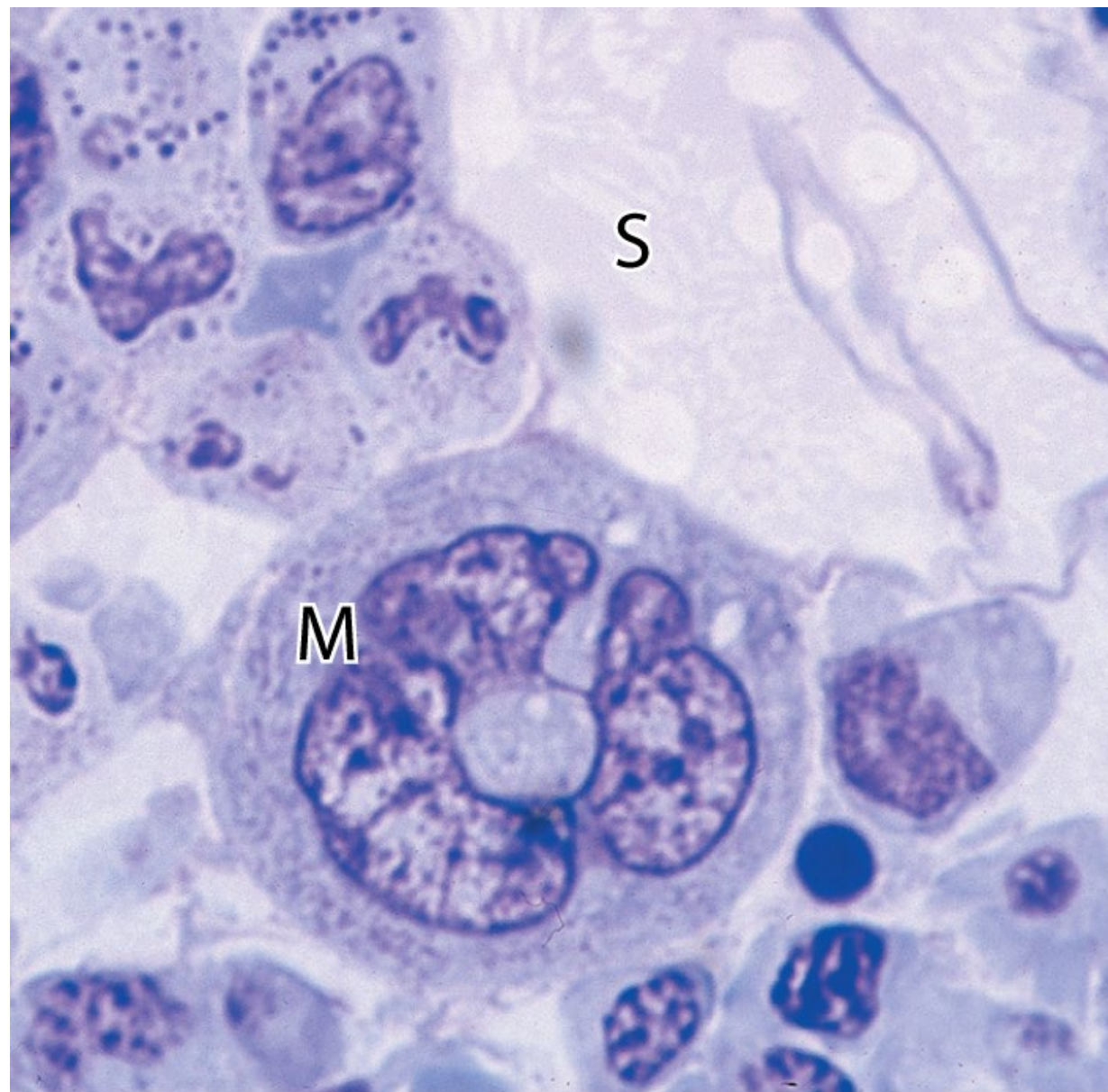
Мегакариоцит образуется из мегакариобласта в результате эндомитоза. В ходе многократной репликации ДНК и накопления цитоплазмы без последующего карио- и цитокинеза образуется крупная клетка (100 мкм) с очень большим дольчатым ядром. Ядро может содержать до 32 копий ядерной ДНК. В цитоплазме образуется развитая система демаркационных мембран, по которым происходит отделение тромбоцитов.



Мегакариоцит — самая крупная полигональной формы клетка, содержит большое полиплоидное дольчатое («лапчатое») ядро. Хроматин распределён диффузно. Характерно наличие псевдоподий.



Псевдоподии проникают в просвет капилляров, где от них отделяются тромбоциты (кровяные пластинки).



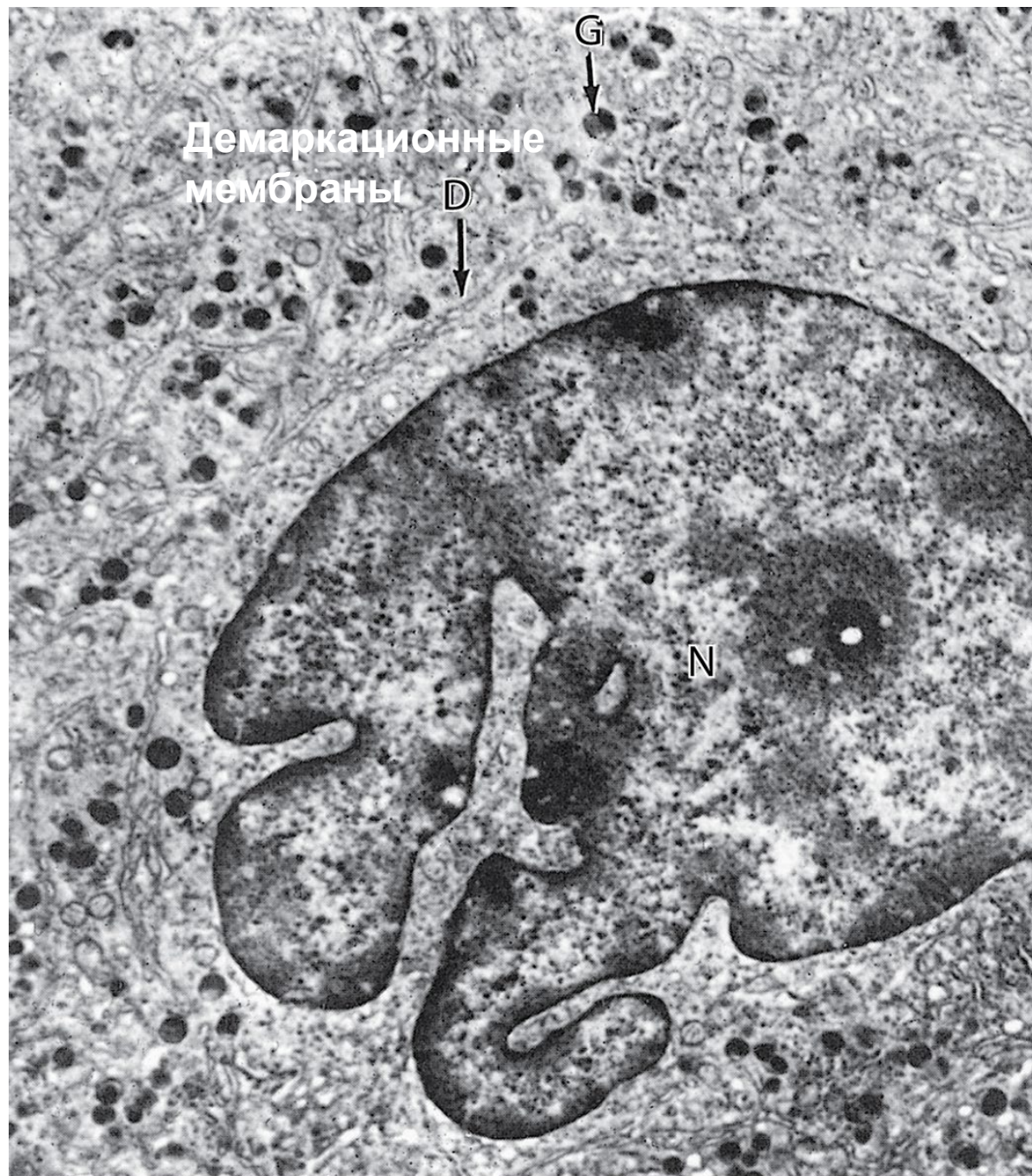
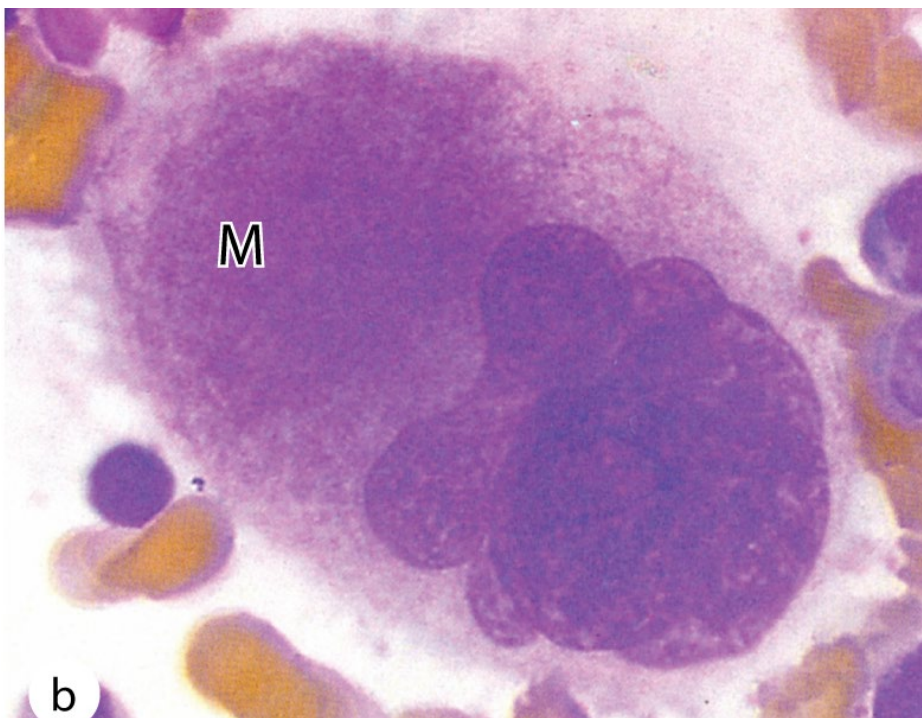
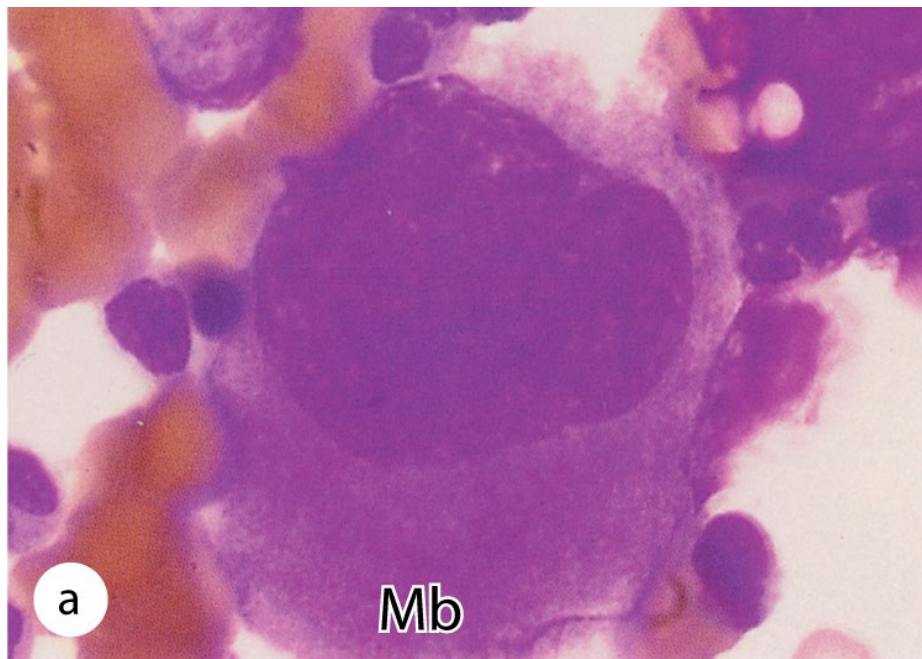
ЭндоМИТОЗ

Эндомитоз характеризуется удвоением числа хромосом внутри ядра без разрушения ядрышка и образования веретена деления. Это приводит к увеличению числа хромосом в клетке иногда в десятки раз по сравнению с диплоидным набором. Так возникают полиплоидные клетки.

Пропорционально увеличению числа генов растёт масса клетки, что повышает её функциональные возможности.

В норме этот процесс встречается очень часто в клетках печени (гепатоцитах), кардиомиоцитах и мегакариоцитах красного костного мозга. С генетической точки зрения эндомитоз представляет собой геномную соматическую мутацию.

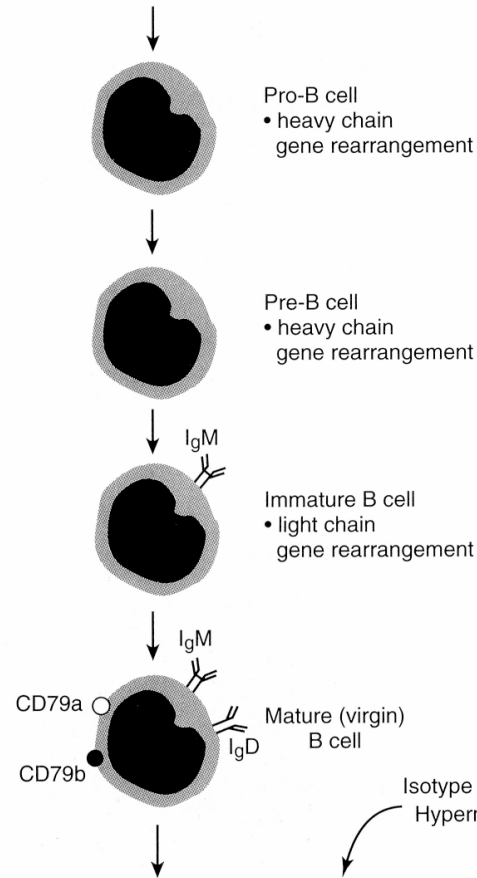
Аномалии количественного состава хромосом называют геномными мутациями, поскольку они связаны с нарушением целостности (состава) генома организма. Нарушения числа копий целого хромосомного набора — моно- либо полиплоидия (три, тетра, пента и т.д.). У человека данный тип патологии летален. Анеуплоидии — нарушения числа хромосом, где различия касаются одной конкретной хромосомы: либо её утрата (моносомия, $2n-1$), либо, появление дополнительной хромосомы (три и полисомия, $2n + 1$; $2n + 2$; $2n + 3$).



Лимфоцитопоэз

CFU-blast → CFU-Ly → CFU-LyB & CFU-LyT & CFU-LyNK

Предшественница
В-лимфоцитов



Migrate to:

- Outer cortex of lymph nodes
- Lymphatic follicles of spleen
- Gut-associated lymphoid tissue and await antigen exposure

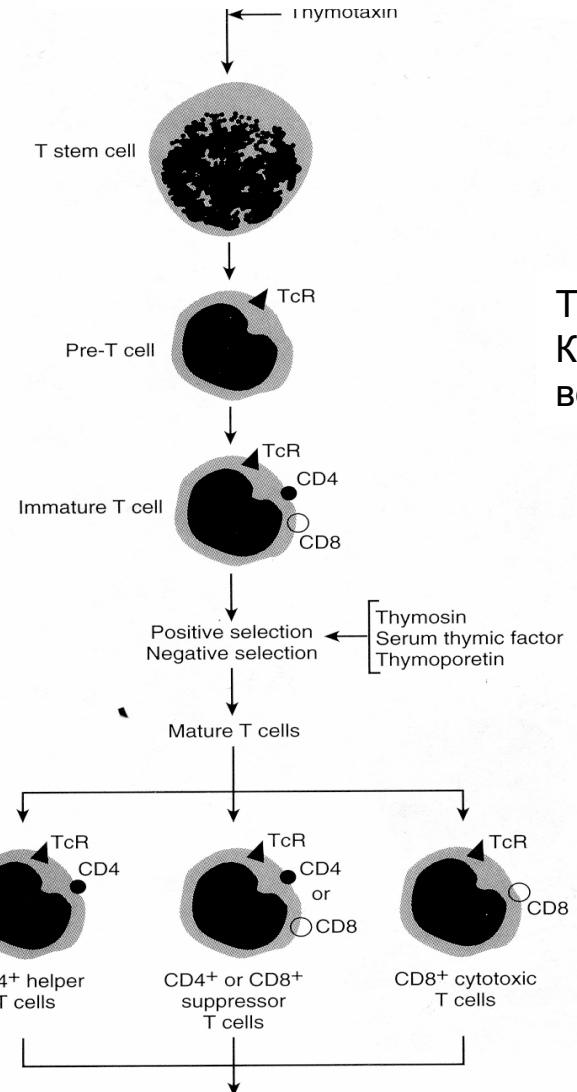
Antigen exposure

Plasma cell

Красный
костный
мозг

Предшественница
NK-клеток
дифференцируется и
созревает в основном
в костном мозге.

Предшественница
Т-лимфоцитов



Exogenous
antigen
Endogenous
antigen

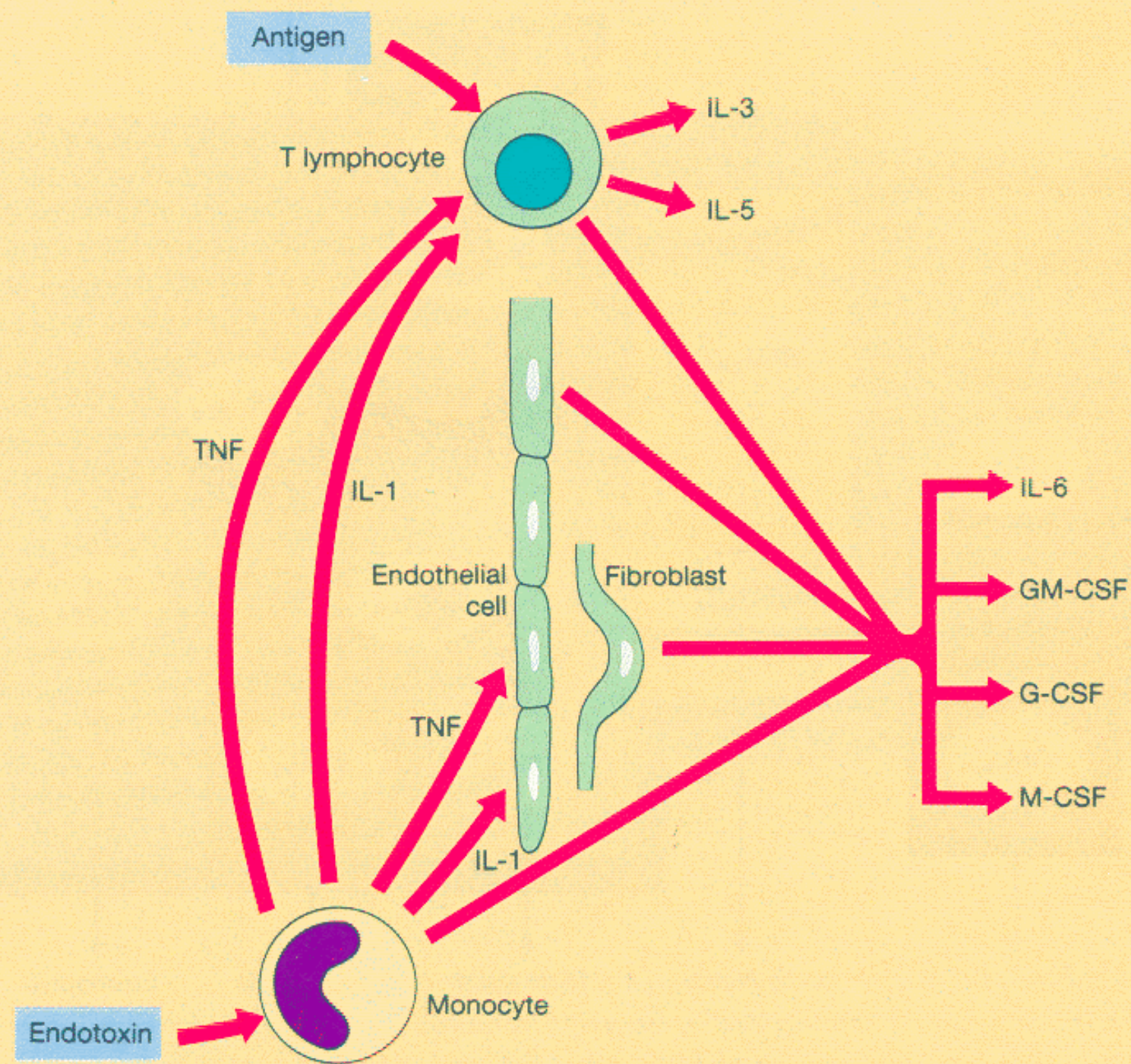
Migrate to:

- Paracortex of lymph nodes
- Peri-arterial lymphatic sheath (PALS) of spleen
- Gut-associated lymphoid tissue (GALT) and await antigen exposure

Красный
костный
мозг

Тимус
Корковое
вещество

Тимус
Мозговое
вещество



Факторы гемопоэза

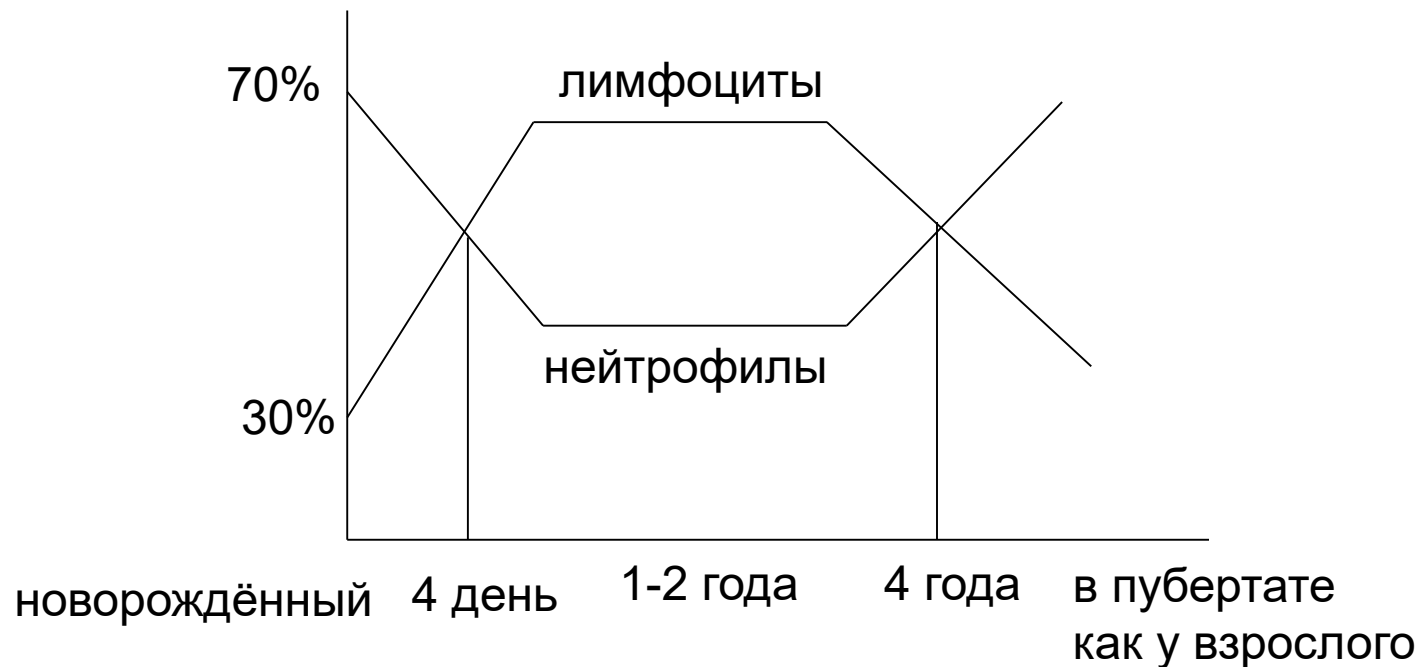
- Фактор стволовых клеток (SCF)
- Колониестимулирующие факторы (CSF)
- Интерлейкины
- Эритропоэтин (из почки)
- Тромбопоэтин (из печени)
- Витамины B₆ (пиридоксин в синтезе гемоглобина), B₉ (фолиевая кислота в синтезе ДНК), B₁₂ (цианокоболамин кофактор фолиевой кислоты).

Возрастные изменения гемограммы

Эритроциты: $7,5 \times 10^{12}$ в 1 л у новорождённого → на 10-14 день жизни как у взрослого → снижается до $3,5 \times 10^{12}$ в грудном возрасте → постепенное увеличение содержания клеток к пубертату.

Лейкоциты: $10-30 \times 10^9$ в 1 л у новорождённого → на 14 день жизни снижается до $9-15 \times 10^9$ → достигает значений взрослого к пубертату.

Первый и второй физиологический перекрёст кривой нейтрофилов и лимфоцитов



Клиническое применение стволовых кроветворных клеток

Трансплантация стволовых кроветворных клеток производится при лечении ряда врождённых заболеваний крови (апластическая анемия, β -талассемия, серповидноклеточная анемия, лимфопролиферативный синдром, связанный с X-хромосомой и др.) и гемобластозов (лимфом и лейкоз), при химиотерапии рака для поддержания пула полипотентных кроветворных клеток красного костного мозга.

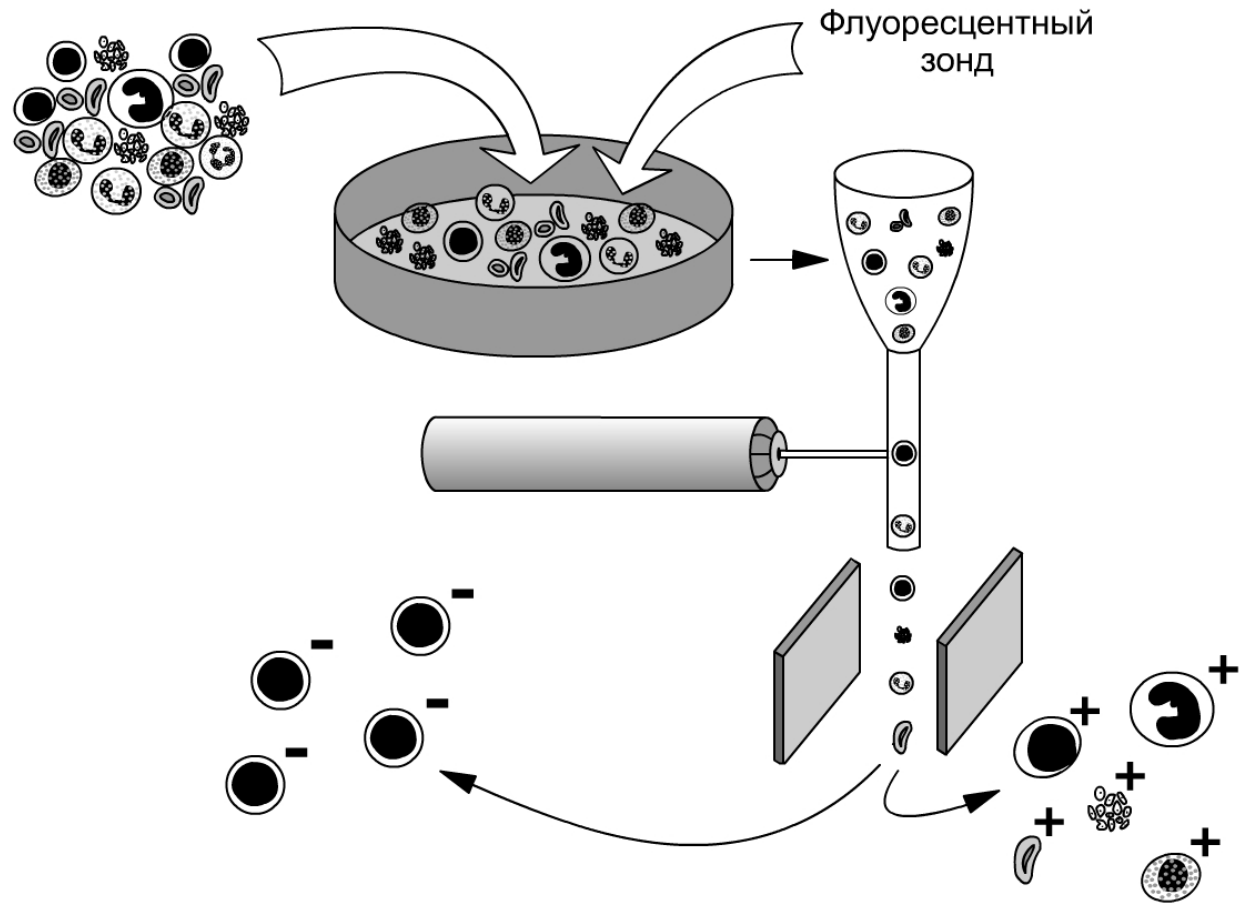
Получение стволовых кроветворных клеток

Красный костный мозг. В среднем удаётся выделить одну стволовую кроветворную клетку на каждые 100 000 полученных аспирацией клеток.

Периферическая кровь. Инъекция колониестимулирующих факторов за несколько дней до забора крови стимулирует выход стволовых кроветворных клеток из красного костного мозга в кровь. Так, при получении из крови стволовых кроветворных клеток их количество составляет менее 0,1% ядродержащих клеток.

Пуповинная кровь. Доля (процент) общего количества клеток CD34+ у доношенных детей составляет 0,3%.

Проточный цитофлуориметр (лазерный сортер клеток)



Сортировка клеток методом проточной цитометрии осуществляется по критерию связывания с ними флуоресцентных зондов. Каждый клеточный тип имеет характерные АГ на своей мембране. Специфические АГ, конъюгированные с флуоресцентным зондом, связываются с Аг на поверхности клеток, например с CD34+ на мембране стволовой кроветворной клетки. Под давлением клетки проходят по капилляру, где меченые CD34+-клетки под действием лучей лазера получают отрицательный электрический заряд. В электрическом поле происходит разделение клеток, несущих положительный или отрицательный заряд.

Одна из наиболее значимых областей для использования клеточного сортера — это сортировка стволовых клеток для их применение в клинической трансплантологии.