ЗАТВЕРДЖЕНО
Наказ МОНУ
від 05 червня 2013 року № 683
Форма № Н-3.04

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДВНЗ «Приазовський державний технічний університет»
Факультет____інформаційних технологій_____
Кафедра _____Біомедичної інженерії_____

ЗАТВЕРДЖУЮ
Декан факультету
інформаційних технологій
_____Верескун М.В.
«____»_____2020 р.

КОНСПЕКТ ЛЕКЦІЙ

РЕГЕНЕРАТИВНА МЕДИЦИНА ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ В ОРТОПЕДІЇ
(REGENERATIVE MEDICINE AND BIOTECHNOLOGY IN ORTHOPEDICS)

напряму підготовки 163 «Біомедична інженерія»
(шифр і назва напряму підготовки)

Розроблено в рамках проекту «Erasmus+ (CBHE) BioArt: «Інноваційна мультидисциплінарна навчальна програма зі штучних імплантів для біоінженерії для рівнів бакалавр та магістр»

Developed in the frame of project «Erasmus+ (CBHE) BioArt: Innovative Multidisciplinary Curriculum in Artificial Implants for Bio-Engineering BSc/MSc Degrees» (586114-EPP-1-2017-1-ES-EPPKA2-CBHE- JP)

2019– 2020 навчальний рік

Регенеративна медицина та біотехнології в ортопедії [Електронній ресурс] : конспект лекцій з дисципліни «Регенеративна медицина та біотехнології в ортопедії» для студентів спеціальності 163 «Біомедична інженерія» денної та заочної форм навчання / уклад. О.Ю. Азархов. – Маріуполь: ДВНЗ «ПДТУ», 2019. – 67 с.

Містить лекційні матеріали, згідно програмі курсу, контрольні питання до кожної лекції, перелік основної та додаткової літерату.

Укладач А.Ю. Азархов, д.м.н., професор

Розроблено в рамках проекту «Erasmus+ (CBHE) BioArt: «Інноваційна мультидисциплінарна навчальна програма зі штучних імплантів для біоінженерії для рівнів бакалавр та магістр»

Developed in the frame of project «Erasmus+ (CBHE) BioArt: Innovative Multidisciplinary Curriculum in Artificial Implants for Bio-Engineering BSc/MSc Degrees» (586114-EPP- 1-2017- 1-ES-EPPKA2-CBHE- JP)

Рекомендовано
на засіданні кафедри «Біомедична інженерія»,
протокол № 21 від 24 червня 2019 р.

Схвалено методичною комісією
факультету інформаційних технологій,
протокол № 10 від 24 червня 2019 р.

© ДВНЗ «ПДТУ», 2019
© О.Ю. Азархов, 2019

ЗМІСТ

	стр.
Вступ ……	5
Лекція 1 – Вступ до регенеративної медицини ……	6
1.1. Історія виникнення та розвитку……	6
1.2. Класифікація клітинних технологій ……	9
1.3 Цілі і принципи використання клітинної терапії ……	10
Лекція 2 – Стовбурові клітини ……	14
2.1. Лікування стовбуровими клітинами ……	14
2.2. Аутологічні стовбурові клітини ……	16
2.3. Стромальні клітини жирової тканини ……	16
2.4. Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини……	18
2.5. Стовбурові клітини ембріо- фето-пуповіно- плацентарно-амниотического комплексу……	23
2.6. Алогенних гемопоетичні стовбурові клітини пуповинної крові…	25
2.7. Гемопоетичні стовбурові клітини зрілої плаценти людини……	29
2.8. Стовбурові клітини амніону людини……	32
Лекція 3 – Культивування клітин ……	36
3.1. Культивування стромальних клітин кісткового мозку щура на коллагене I типу різного походження ……	37
3.2. 3D-культивування: від окремих клітин до регенераційної тканини ……	38
3.3. Хромосомніаберації, що виникають в ембріональних стовбурових клітинах людини в процесі культивування……	39
3.4. Виділення і культивування гемопоетичних стовбурових клітин	42
3.5. Попередня іммунокоррекція і культивування клітин кісткового мозку……	44
3.6. Наступність цитогенетичних характеристик в пасажах ембріональної гермінативної клітинної лінії миші G1……	45
Лекція 4 – Клітинна інженерія ……	50
4.1. Трансфекція клітин і генна інженерія……	50
4.2. Гібридизація соматичних клітин …….	51
4.3. Клонування клітин ……	53
4.4. Способи клонування ……	54

4.4.1. Технологія отримання партеногенетических ліній ембріональних стовбурових клітин комбінацією з методом перенесення ядра. 56
4.4.2. Створення гістосумісності ембріональних стовбурових клітин методом партеногенезу. …… 59
4.4.3. Гемопоетичне диференціювання і терапевтичний потенціал уні парентних партеногенетических ембріональних стовбурових клітин…… 62
…
4.4.4. Репрограммування за допомогою ембріональних стовбурових гібридних клітин . 64
……
Рекомендована література …… 67

ВСТУП

Регенеративна медицина - провідний напрямок медико-біологічної науки, заснований на використанні механізмів регенерації, що існують в організмі людини.

Головною ідеєю регенеративної медицини є максимально можливе відновлення структури і функцій пошкоджених тканин або органів шляхом заміни пошкоджених структур і/або стимулювання ендогенного потенціалу регенерації. В результаті максимального лікувального ефекту і відновлення, порушених або втрачених функцій організму за допомогою методів регенеративної медицини, вдасться забезпечити підвищення якості життя пацієнтів.

Регенеративна медицина - комплекс молекулярно-біологічних, фармацевтичних, клітинних, тканинно-інженерних підходів, що дозволяють досягати максимально можливого відновлення структури ушкоджених захворюванням або травмою органів і тканин і відповідно максимально-можливого відновлення функцій.

Регенеративна медицина утворилася в результаті взаємодії кількох наукових дисциплін: ембріології, цитології, молекулярної генетики, генної інженерії є яскравим прикладом тієї науки, де межі між фундаментальними і прикладними дослідженнями практично стерті.

Визначальну роль в регенеративної медицини грають науково обґрунтовані підходи, методи і технології, спрямовані на відновлення і керовану регенерацію пошкоджених тканин і органів, а також збереження їх структури і функцій.

Лекція 1 – Вступ до регенеративної медицини.

План

1.1. Історія виникнення та розвитку
1.2. Класифікація клітинних технологій
1.3. Цілі і принципи використання клітинної терапії

1.1. Історія виникнення та розвитку

Концепція запровадження клітин в організм людини з метою лечения виникла давно. Повідомлення про першу спробу переливання крові від вівці людині було у Франції в 1667 році. Під час кримської війни Н.І. Пирогов здрібнів тканини підшлункової залози коней і заповнював цією кашкою гнійні рани, які на диво швидко гоїлися. Сам Н.И.Пирогов приписував та- дещо дію унікальним властивостям підшлункової залози, але не виключено, що в рани потрапляли і стовбурові клітини, содержавші- еся в кінських тканинах.

Згадки про перших експериментах по трансплантації клітин і тканин відносяться до кінця XIX століття. У 1890 році Thomson в New York University проводив експерименти по трансплантації клітин головного мозку від кішки. У 1884 році Wiliams повідомляє про подкожної імплантації фрагментів тканини підшлункової залози вівці хворому на цукровий діабет. У 1907 році R. Ottenberg виконав першу обґрунтовану клітинну трансплантацію у людини, кото рій стало переливання АВ0-сумісної крові. У 1922 року в США наднирники плоду були пересаджені двом пацієнтам з хворобою Аддісона з тривалим терапевтичним ефектом. У 1928 року в Італії була проведена перша безуспішна пересадка поджелу- дочной залози пацієнта з інсулін-залежним цукровим діабетом. У 1931 році в Швейцарії Paul Niechans врятував від смерті хвору, яка перебувала в судорожному статусі після помилкового видалення прищитоподібних залоз, вперше в світі пересадивши їй суспензію клітин околощітовідной залози теляти. Приблизно в цей же час російський лікар С. Воронцов проводив ін'єкції фетальних клітин людини у Франції з метою омолодження. У 1951 році Lorens і ін. Продемонстрували виживаність летально опромінених тварин після трансплантації кісткового мозку.

Сучасний етап розвитку клітинних технологій починається з 1968, коли групою вчених під керівництвом ED Thomas б-ла проведена перша успішна трансплантація HLA-сумісного кісткового

мозку хворому на лейкемію, а в лабораторії Роберта Гуда - трансплантація стовбурових клітин дитині з важким уродженим імунодефіцитом. У 1972 році WF Bellinger, PE Lacy експериментально обгрунтували ефективність, а в 1986 році клінічно ви- катували трансплантацію острівцевих клітин підшлункової залози для лікування цукрового діабету. У 1987 році O. Lindvall et al. здійсню- ствілі трансплантацію хромаффинной тканини фетальних надпочеч- ників в стриатум для лікування важких форм порушення двигун ної активності при хворобі Паркінсона. У 1988 році E. Gluckman et al. у Франції здійснена перша успішна трансплантація пу- повинною крові дитині з анемією Фанконі. З 1992 року M. Mito et al. виробляються трансплантації гепатоцитів хворим з печінковою недостатністю. У 1996 році SE Paper et al. здійснена перша клінічна клітинна генотерапія за допомогою трансплантації аутологічних гепатоцитів, трансфікованих геном рецептора ліпопротеїдів низької щільності дітям з сімейної гіперхолестері- неміей, а A. Fassas et al. почали клінічні випробування трансплан- тації мобілізованих в периферичний кровообіг аутологічних гемопоетичних клітин при розсіяному склерозі. У 1997 році нача лась масова комерціалізація клітинної терапії і тканинної інженеро, отримані ліцензійні комерційні клітинні продук- ти в США (Evans JR et al., 2012; Rivera FJ, Aigner L., 2012; Ben-Hur T. et al., 2013; Lopez WO et al., 2013; de Munter JP et al., 2014; Mo- chizuki H. et al., 2014 року).

У 1998 році американські вчені Джеймс Томсон і Джон Беккер виділили людські ембріональні стовбурові клітини і по- лучілі перші лінії цих клітин. У наступні роки здійсню- лени трансплантація алогенних гепатоцитів дитині з спадкоємця жавної формою жовтяниці, трансплантація нервових клітин в голів- ної мозок людини, який переніс інсульт, аутологічної трансплантація пуповинної крові з приватного кріобанку, клітинна кардіо- міопластіка (введення клітин в серці) після інфаркту (Menasche P. et al., 2001), трансплантація алогенних мультіпотентних мезен- хімальних стромальних клітин кісткового мозку дітям з недосконаліть ним остеогенез і багато іншого. Всім клінічним напрацювань передувала копітка експериментальна робота на живітних.

Клітинна трансплантологія - лідируючий і інтенсивно раз -вива розділ науки про пересадку органів і тканин. Успіх і перспективи нової медичної технології - трансплантації клітин - багато в чому визначило розвиток біотехнології, клітинної та молекулярної біології.

Разом з тим розробка ефективних методів клітинної те- рапии, безумовно, вимагає всебічного глибокого вивчення процессов життєдіяльності ендогенних прогеніторних клітин в нормі і при патологічних станах.

Відповідно до сучасних уявлень, стовбурові клітини су- ществуют в дорослому організмі ссавців, в тому числі че- ловека, у багатьох тканинах. При цьому найбільш значною і мо більной популяцією елементів, що володіють унікальною спосіб-ністю до самопідтримки і диференціювання в багато специа- лизировать клітинні типи, є популяція мультіпотент- них мезенхімальних СК (МСК) кісткового мозку. У той же час в інших органах в постнатальному періоді також присутні клітини, які мають досить високим проліферативним і дифференцировочного потенціалом - регіональні клітини попередники, призначенням яких, як і вищеназваних МСК, служить забезпечення регенерації тканин у відповідь на фізіолого ня спад клітин або їх загибель , викликану фактором, що ушкоджує (Гольдберг Е.Д. і ін., 2006 б; Дигай А.М. та ін. 2009 б; Дигай А.М. та ін., 2011 а, в; Xiao-Cheng LU et al. , 2012).

Слід зазначити, що СК можуть НЕ тільки симетрично деліться (утворюючи дві однотипні дочірні клітини), а й здатні до асиметричному поділу, в результаті якого одна з клітин з- що зберігаються мультипотентні потенціал, а інша виявляється коммі- тірован, то є вже направлена в своєму розвитку в определен- ву сторону. При цьому підтримка популяції СК залежить від авто- автономних регуляторів (модельованих зовнішніми сигналами), контро- лірующіх їх розподіл, а також експресію тих чи інших генів. Зовнішні сигнали, що визначають долю СК, в свою чергу, реали- ся за допомогою зміни функціонування так званого мікрооточення - клітинних елементів, НЕ приймають непо безпосередніх участі в виконанні основної функції тканини, і компонентів позаклітинних структур. Клітинні елементи оказують активну регуляторний вплив як за допомогою вироблення широкого спектра гуморальних факторів, так і за рахунок утворення прямих міжклітинних контактів. Межмембранное зв'язування при цьому служить для передачі необхідних поживних речовин, ми- грації і хоумінга («осідання» і «приживлення») клітин попередників в специфічних ділянках тканини, в яких (під впливом нового микроокружения по відношенню до СК) відбувається їх подальший розвиток. Крім того, завдяки безпосередньому міжклітинному взаємодії, ростові фактори: специфічні фактори росту, гормони і гормоноподобниє речовини,

надавати пріоритет ляють КП в біологічно доступній формі (Гольдберг Е.Д. і ін., 2007; Дигай А.М. та ін., 2009 а, б)

Вельми цікавим і надзвичайно важливим є наявність у прогеніторних клітин ще однією унікальною функцио- нальної здатності. Зокрема, їх можливості під впливом певних факторів і змін з боку елементів мікро- оточення залишати тканинну «нішу» (локальне местонахожде- ня СК, де вона знаходиться в «спокійному» стані), потрапляти в кровотік і циркулювати в ньому, з подальшим « осіданням »в необхідному для організму в даний момент місці і розвитком в напрямку, програмованому« новим »специфічним мікро- оточенням (Дигай А.М. та ін., 2011 у, г; Young F. et al., 2013).

1.2. Класифікація клітинних технологій

Клітинна трансплантологія включає різні клеточні технології і має на увазі наступні послідовні етапи:

- виділення клітин з тканини організму;
- маніпуляції з клітинами ex vivo (очищення, фракціонірова- ня, культивування, генмодіфікація);
- введення клітин в організм.

Трансплантація клітин є основним інструментом з- тимчасової регенеративної медицини. Трансплантація, здійснюва- ється простий ін'єкцією клітин з метою лікування хворого або корекції будь-якого патологічного стану, називається

« Клітинною терапією».

Клітинна терапія може здійснюватися як:

- самостійний метод;
- у вигляді клітинної генотерапії;
- у вигляді тканинної інженерії.

Пептидная терапія, що виникла при вивченні механізмів дії пересаджених клітин і регенерації in situ, виділилася в окремий напрям регенеративної медицини.

Клітинна терапія - науковий метод, що розвивається шляхом синтезу передових досягнень імунології, медичної гене- тики, молекулярної біології і біологічної хімії.

Оформився науково-практичний сектор молекулярної і клеточної біології - реконструктивна біологія, завдання якої з- варто в отриманні необхідного біотехнологічного продукту:

- макромолекул і їх комплексів (наприклад, генетичних конструкцій);
- генетично модифікованих клітин;
- клітинних ліній;
- клонів клітин;
- асоціацій клітин із заданими характеристиками.

Підходи і методи реконструктивної біології в медицині служать справі створення біомедичних діагностичних і лечеб- них технологій:

- медична генна інженерія;
- генодіагностика;
- генотерапія;
- клітинна інженерія;
- клітинна терапія;
- тканинна інженерія;
- тканинна терапія;
- органна інженерія;
- органна терапія.

Терміном «клітинна терапія» позначається як терапія клітинами, так і терапія власне клітин.

Терапія стовбуровими клітинами - це передня лінія современної біотехнології та медицини, перед якою стоять важкі про- блеми біологічного і медичного плану, законодавства, морально-етичні, економічні та інші. Клітинні техноло- гии потребують наявності спеціалізованої наукомісткої бази і кваліфікованих фахівців.

Основний принцип клітинної терапії - відновлення по- врежденних в результаті травми або захворювання тканин і органів за допомогою трансплантації живих клітин в організм тварини і людини. В основі клітинної терапії лежить внутрішньовенна, внутрішньоартеріальна, внутріорганная трансплантація різного клітинного матеріалу (ембріональних стовбурових клітин, аутоло- гічної і алогенних стовбурових клітин дорослого організму, фе тальних прогеніторних клітин) для заміщення втрачених, чи не активних або пошкоджених клітин (Яригін В.М. , 2004).

1.3. Цілі і принципи використання клітинної терапії

Основними цілями клітинної терапії є:

1. Заміщення нефункціонуючої або дефектної тканини або клітинної популяції;

2. Стимуляція власних прогеніторних клітин організму і посилення репаративної регенерації;

3. Адресна доставка лікарських засобів, генетичних конструкцій і біомолекул.

В ембріональних і плацентарних тканинах знаходиться більШОЕ кількість різних регуляторних речовин, таких як:

- фактор росту фібробластів,
- фактор росту нервів,
- фактор, що стимулює зростання макрофагальні і ерітроід- них колоній,
- інсуліноподібний і ендотеліотропний фактори росту, і, що особливо важливо,
- антипроліферативні цитокіни, що запобігають гіпер- стимуляцію (Greenberg DA, Jin K., 2013).

Ці речовини є потужними регуляторами, що впливають на власні клітини організму реципієнта, що коректують їх функціональний стан і взаємодія, що в багатьох випадках сприяє відновленню їх нормальної життєдіяльність ності.

Найчастіше пацієнтові, котрий переніс пересадку чужорідної тканини, доводиться приймати препарати, що пригнічують іммуні- тет і, тим самим, що попереджають відторгнення чужих клітин. Пересадка ембріональних і фетальних клітин вкрай рідко з- супроводжується реакцією відторгнення, по крайней мере, поки ті не пройдуть диференціацію. А за цей час в організмі происхо- дит багато подій: активні речовини, що виробляються переса- женнимі клітинами, включаються у взаємодії між клітинами самого реципієнта і нормалізують їх. Залежно від ха рактер захворювання і стану організму реципієнта може знадобитися нова пересадка. Період поліпшення стану, до- торий забезпечують пересаджені клітини, триває близько року і іноді більше.

Оптимальним можна вважати виділення власних стволо- вих клітин потрібного типу з тканин хворого з подальшим їх розмноженням в лабораторних умовах. Було виявлено, що у дорослої тварини і людини є запас стовбурових клітин в кількості, доступному для виділення і розмноження "в пробірці". Ці клітини зберігаються, в тому числі, в жировій тканині, з якої їх можна виділити, розмножити, створити умови для диференціювання ації в клітини потрібного типу і повернути їх в той же організм.

Іншим важливим напрямком наукових досліджень є- ється розробка методів впливу на клітини імунної системи реципієнта для цілеспрямованого придушення разрушітель- ного дії імунної системи на пересаджені клітини.

Проблеми використання низьких температур в лікувальних цілях і завдання зберігання біооб'єктів при низькій температурі з метою подальшого їх використання в клітинної трансплантології ре- шают кріобіологія і кріомедицина.

Для цього використовуються:

- програмні замораживателі-розморожувачі;
- низькотемпературні банки - біохраніліща з системами контролю температури;
- сублімаційні установки;
- апарати універсальної гіпотермії;
- кріоелектрокоагулятори;
- кріоінструментів;
- низькотемпературні сховища для ембріонів і сперми;
- різноманітна контрольно-вимірювальна апаратура.

В даний час методи трансплантації ембріональних клітин (ЕК) і окремих виділених соматичних клітин (СК) використовують:

в фундаментальних дослідженнях для:

- вивчення ембріогенезу тканин і органів;
- вивчення процесів диференціювання тканин і клітин раз- них типів;
- вивчення взаємодії різних типів клітин між з- бій, в тому числі для конструювання органів in vitro;
- отримання генетичних химер, в тому числі для вивчення механізм імунітету і імунного відторгнення тканин, іммуноде- фіцітов і імунної толерантності;
- отримання моделей генетичних захворювань людини;
- вивчення функціонування різних нервових центрів (пересадки гіпоталамічних ядер, епіфіза);
- вивчення механізмів старіння і розробки методів омоло- вання тканин (пересадки нервових центрів, епіфіза);

в клінічній практиці для:

- лікування захворювань системи крові (лейкози, анемії, метаболіческіе хвороби);
- лікування вроджених імунодефіцитних станів;

- корекції імунодефіцитних станів після хіміотера- ПІІ і опромінення;

- лікування генних захворювань людини всілякої при- пологи (метаболічні захворювання, дегенеративні захворювання);

- лікування гострої печінкової недостатності, цирозу і спадкових метаболічних захворювань печінки;

- лікування різних міодистрофія, в тому числі з перенесенням соматичних міобластів;

- лікування дегенеративних захворювань нервової тканини, інсуль- тов, паркінсонізму;

- лікування генетичних і дегенеративних захворювань репродуктівной сфери;

- корекції інсулінозалежного діабету, важких форм течення;

- лікування дегенеративних та інших уражень шкіри, слизової, хрящів, очей і вуха.

Питання до лекції:

1. Історія розвитку уявлень про регенерацію органів і тканин.
2. Поняття про регенерацію.
3. Поняття про регенеративну медицину.
4. Місце регенеративної медицини в системі біологічних і медичних знань і в охороні здоров'я.
5. Міжнародно-правові акти, що регламентують застосування методів молекулярної і клітинної медицини в дослідженнях і практичній медицині.

Лекція 2 – Стовбурові клітини

План

2.1. Лікування стовбуровими клітинами
2.2. Аутологічні стовбурові клітини
2.3. Стромальні клітини жирової тканини
2.4. Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини
2.5. Стовбурові клітини ембріо- фето-пуповіно- плацентарно-амниотического комплексу
2.6. Алогенних гемопоетичні стовбурові клітини пуповинної крові
2.7. Гемопоетичні стовбурові клітини зрілої плаценти людини
2.8. Стовбурові клітини амніону людини

2.1. Лікування стовбуровими клітинами

Це лікування за допомогою:

- ембріональних стовбурових клітин;
- клітин ембріо- фето-пуповинної-плацентарно-амниотического комплексу;
- стовбурових клітин дорослого організму;
- біологічно активних речовин, що виділяються стовбуровими клітинами.

Суть методу клітинної і тканинної трансплантації полягає в:

- активації компенсаторних ресурсів пошкоджених клітин і тканин реципієнта;
- стимуляції нових механізмів відновлення регенерації;
- заміщення втрачених структур і функцій органу, тканини. При цьому пацієнт отримує ряд біологічно активних, сба-

лансірованних з'єднань природного походження, обла- дають різноспрямованим фармакологічною дією і здатного надавати вплив на різні сторони метаболізму целостного організму і клітин, які здатні виконувати заместітельние функції.

Стовбурові клітини мають велику пластичністю, темп про- ліферації в них істотно вище, ніж в зрілих структурах, вони здатні дифе-ренціюватися в залежності від мікрооточення.

Слід зазначити, що клітинна терапія вимагає індивіду- ального підходу і діагностики характеру порушень. У відпо відно до виявлени-

ми порушеннями проводиться індивідуальний підбір схем і препаратів для лікування.

Існують наступні методики клітинної терапії:

- лікування за допомогою ембріональних і фетальних стовбурових клітин;

- лікування за допомогою препаратів ембріо- фето-пуповіно-плацентарно-амниотического комплексу;

- лікування за допомогою аутологічних стовбурових клітин, напів- чинних з периферичної крові;

- лікування за допомогою аутологічних стовбурових клітин, напів- чинних з кісткового мозку;

У генної та клітинної терапії застосовуються кілька типів стовбурових і прогеніторних клітин:

- мезоангіобласти;

- м'язові стовбурові клітини;

- дорослі мультипотентні прогеніторні клітини. Мезоангіобласти знаходяться поруч з судинами. нещодавно установілі, що вони можуть частково відновлювати функцію м'язів у мишей з м'язовою дистрофією, спричиненої нестачею білка дельта-саркоглікана.

М'язові стовбурові клітини виробляють кілька білків, необхідних для побудови м'язів. Ці клітини, схоже, об'єд ють властивості гематопоетичних і міобластів, і очікується, що з їх допомогою вдасться підтримувати регенерацію крові, м'язів і кісток.

Дорослі мультипотентні прогеніторні клітини в культурі диференціюються в клітини ендотелію, нейроектодерми і ентодер- ми. Коли їх підсаджували в 3,5-денні мишачі бластоцисти, в які виросли з цих зародків химерних мишах виявлялося при- мірно 45% нащадків таких клітин. Це показує, що потенціал, що дозволяє перетворюватися в клітки всіх трьох шарів, у таких клітин близький до потенціалу ембріональних. Після ін'єкції таких клітин мишам з однієї з форм діабету і важкої імунної недостатньо- стю клітини приживалися в різних нішах, таких, як кістковий мозок, селезінка, кишечник, легеневий епітелій, кров. Використання цих клітин гальмується тим обставиною, що для їх вирощування в культурі потрібні незвичайні штучні умови, які приво- дять до епігенетичних змін в клітинах.

2.2 Аутологічні стовбурові клітини

Периферична кров . Протягом 4 діб перед забором крові пацієнтові вводиться спеціальний препарат - гранулоцітар- ний колонієстимулюючий фактор (Г-КСФ), який значитель- але збільшує число стовбурових клітин в периферійній крові. Забір крові здійснюється з вени процедурою аферезу, використ чаплі спеціальну медичну апаратуру і спеціальний набір для забору стромальних стовбурових клітин організму. Кров пере- носиться в лабораторію клітинних культур в стерильних пробір- ках. Робота з кров'ю проводиться стерильно в ламінарному боксі. Клітини культивують, стимулюючи їх зростання і розмноження на спе- ціальних поживних середовищах і екстраклеточной матриксе до певної кількості, достатнього для проведення курсу ле- чения. Оскільки стовбурові клітини можуть бути культивовані нескінченно (ці клітини безсмертні), частина клітин заморожується і поміщається в криобанк під індивідуально присвоєним номером для проведення наступного циклу терапії.

Спосіб введення, кількість і кратність введення клітин ви- виділяється строго індивідуально в залежності від патології.

Кістковий мозок. Забір кісткового мозку здійснюється з крила клубової кістки під наркозом. Кістковий мозок переноситься в лабораторію клітинних культур в стерильних пробірках. Робота з кістковим мозком проводиться стерильно в ламінарному боксі. За допомогою сортування клітин і особливих прийомів культивування, з кісткового мозку виділяють гемопоетичні і мезенхімальні будів формальні стовбурові клітини. Подальші маніпуляції аналогічні маніпуляціям зі стовбуровими клітинами периферичної крові.

2.3. Стромальні клітини жирової тканини

В останні роки в біомедицині особливий інтерес викликають клітини, одержувані з жирової тканини. Для отримання цих клітин використовується ферментативна обробка колагеназою зразків жи ровой тканини, отриманої при косметичної ліпосакції або в ході хірургічного видалення жирового відкладення. Подальше цін- тріфугіроваліе дозволяє позбутися від адипоцитів і отримати осадочную фракцію клітин стромально-васкулярного фенотипу.

При культивуванні в певних умовах ці клітини здатні диференціюватися в клітини кісткової, хрящової, жиро-вої, м'язової, нервової тканини, в клітини судинної стінки (ендо- теліальние і перицитів).

Популяція свежевиделенних стромальних клітин жирової тканини (СКЖТ) гетерогенна і характеризуються високим содержаніїм клітин, що експресують антиген стовбурових клітин - CD34. У міру культивування СКЖТ спостерігається збагачення популяції клітинами, що несуть маркери мезенхімних клітин кісткового мозку (> 90%). СКЖТ характеризуються високою проліферативною актив ністю. Вони секретують широкий набір проангіогенних факто- рів, експресія яких посилюється в умовах гіпоксії. Секре- торная активність СКЖТ сприяє виживанню і проліфера- ції ендотеліальних клітин.

Імплантація СКЖТ людини в матрігеле під шкіру миші стимулює розвиток капілярної мережі в імплантаті, а введення цих клітин імунодефіцитних мишам з ішемією задньої конеч- ності стимулює розвиток судин в ішемізованих скелет- них м'язах, що призводить до відновлення кровотоку в конеч- ності.

Трансплантація СКЖТ в периинфарктную зону серця щура сприяє поліпшенню функції серця і стимулює його ревас- кулярізацію. При сокультівірованіі СКЖТ з клітинами, виделен- ними з серця новонароджених щурят, спостерігається утворення більш складних судинних структур клітинами постнатального серця, і ці структури більш стабільні, ніж ті, які утворюються при культивуванні цих клітин без СКЖТ. Стабілізуюча роль СКЖТ реалізується як за рахунок секреції в середу культівірова- ня специфічних факторів, так і завдяки утворенню межклеточних щілинних контактів. При цьому тільки секретується факто- рів для ефективної індукції і стабілізації структур недоста- точно. Важливу роль в стабілізації судинних структур (предпо- ложительно за рахунок утворення коннексін-43-містять щілинних контактів) грають присутні у фракції СКЖТ перицитам.

СКЖТ людини піддаються плазмидной, адено- і лентівірусним трансфекція з високою ефективністю, зберігають висо кую експресію трансгена до 14-30 днів.

Стромальні клітини жирової тканини є по- пуляціях клітин, що володіють високим ступенем пластичності, високою інтенсивністю проліферації, які секретують багато ангіогенних факторів і легко піддаються трансфекції. При досить високому вмісті даного типу клітин в жирової тканини, відносній безпеці і низькою травматичності їх отримання, СКЖТ є перспективними кандидатами для аутологічної трансплантації в ішемізованих тканини з це- ллю стимуляції ангіогенезу, для тканинної інженерії і перспек- тивним клітинним вектором для

генної терапії (Парфьонова Е.В. та ін., 2007; Ржанінова А.А. та ін., 2010).

2.4 Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини

В останні роки застосування ММСК увійшло в терапію множества різних захворювань на рівні клінічних випробувань (Dominici M. et al., 2006; Barry FP et al., 2004; Jorgensen C., 2004). В даний час ММСК використовуються головним чином для сниже- ня вираженості реакції «трансплантат проти господаря» при трансплантації ГСК кісткового мозку у пацієнтів з онкогематоло- гическими захворюваннями (Lazarus HH et al., 2005; Le Blanc K. et al., 2004; von Bonin M. et al., 2009 року; Rodriguez R. et al., 2008), а також в ортопедії (Щепкіна ET AL. і ін., 2007; Puontos I. et al., 2006; Quarto

R. et al., 2001). ММСК мають здатність диференціюватися в напрямку великого числа клітинних типів, хоча естественни- ми їх похідними вважаються остеобласти, хондроцити і адіпо- ціти, а також теноціти. Інтерес клініцистів до ММСК пояснюється НЕ тільки унікальними властивостями цих клітин, а й порівняльною простотою їх виділення з кісткового мозку і експансії in vitro .

За даними більшості авторів, при тривалому культівіро- вання (до 25 подвоєнь) ММСК НЕ піддаються злоякісної трансформації і гинуть за допомогою апоптозу, досягнувши фази ста- ренію (Bernardo ME et al., 2007). Деяким авторам вдавалося культивувати ММСК до 36 (Stenderup K. et al., 2003) і навіть до 56 пасажів (Mareschi K. et al., 2006), перш ніж приріст популяції зупинявся. Тим не менш, в 2006 році було показано, що після шостого пасажу культури ММСК людини, отримані з кістково го мозку різних донорів, в різний час вступають у фазу старіння, чому супроводжує поступове зниження їх проліферативної ак- тивності і здібностей до диференціювання. Точно визначити, коли в кожній конкретній культурі ММСК настане блок пролі- ферації, практично неможливо (Bonab MM et al., 2006). Ці дані були підтверджені в незалежній лабораторії науковою групою W. Wagner, здатною продемонструвати, що ММСК людини після сьомого пасажу зазнають морфологічні зміни, порушення профілю експресії позитивних маркерів CD13, CD29, CD44, CD73, CD96, CD105, CD146 і CD166, і, в кінці концов, перестають пролиферировать (Wagner W. et al., 2008). За цієї причини в терапевтичних цілях переважно викори-

стовувати клітини, що пройшли менш шести пасажів in vitro. Це могло б стати серйозним недоліком в відношенні зручності роботи з ММСК, оскільки обмежений час, який клітини можуть про- вести в культурі, може накладати тимчасові рамки на їх ис користування в клітинної терапії. Однак ММСК, як і будь-яку дру- гую клітинну культуру, можливо зберігати як завгодно довго в замороженому стані, що практично НЕ впливає на їх властивості, по крайней мере, на проліферацію і експресію характерних мар- Керов (Haack-Sorensen M. et al. , 2007), а також на життєздатність і спроможність диференціюватися в остеогенні напрямку (Ка лінина Н.І. та ін., 2011 року; Kotobuki N. et al., 2005).

Більшість питань про кореляції експансії ММСК в культурі з різними характеристиками донорів залишаються від- критими, оскільки дані, одержувані в незалежних лаборато- ріях, сильно різняться. Наприклад, до цих пір не ясно, действитель- але чи існує негативна залежність пролиферативного потенціалу ММСК від віку донора (Bonab MM et al., 2006; Mareschi K. et al., 2006).

Існують поодинокі роботи, присвячені виявленню за- лежно терапевтичного потенціалу ММСК від статі донора (Crisostomo PR et al., 2007). У зазначеній роботі дослідники показали, що ММСК, ізольовані з кісткового мозку самок щурів, надають при трансплантації кращий ефект на восста- новление функцій серця після інфаркту міокарда, ніж ММСК самців.

Відносно інших факторів, наприклад, кореляції експресії ці ММСК маркера CD71 (рецептор трансферину), який при- нято вважати в роботах клітинних біологів маркером проліферації, і реальної проліферації культури, практично немає даних. Хоча для тимоцитов за допомогою проточної цитофлуориметрії б-ла показана пряма залежність проліферативної активності та експресії на мембрані клітин CD71.

Автори поставили за мету визначити залежність проліфера- ції ММСК після кріоконсервації від наступних факторів:

- статі донора;
- віку донора;
- CD71-статусу зразків кісткового мозку, з яких були ви- розділені клітини;
- CD71-статусу культур ММСК перед кріоконсервації.

Вивчали зміни, що відбуваються з клітинами до сьомого подвоєння популяції.

У зв'язку з тим, що проліферативна активність ММСК, напівчинних від різних донорів, строго індивідуальна, а її варіабель- ність може бути дуже широкою, автори вважають, що при кріо- консервації ММСК, призначених для подальшого примене- ня в експериментальній клітинної терапії , має сенс замора- проживати окремо невелика кількість клітин (до 2 млн.) в так званій ампулі-супутнику, які після кріоконсервації бу- дуть негайно розморожені і культивовані до сьомого пас- сажа. За даними про приріст ММСК з ампули-супутника можна буде з великою точністю судити про динаміку зростання основної маси клітин донора, а, значить, планувати терміни підготовки культури ММСК для використання в необхідній кількості і на точно визначеному пасажі.

У роботі були використані культури ММСК, отримані з кісткового мозку 36 донорів у віці від 21 року до 70 років. Серед них 11 осіб практично здорових, 20 - страждають різлічни- ми захворюваннями, виключаючи онкогематологічні та гострі вос- палітельние, і 5 пацієнтів, які страждають на онкогематологічні захворювання (гострий і хронічний мієлолейкоз). Культури ММСК, отримані від різних донорів, в тому числі і від донорів з онкогематологічними захворюваннями, оцінювалися сукупно, так як раніше було показано, що ММСК донорів без онкогемато- логічних захворювань і ММСК пацієнтів з онкогематологічними захворюваннями не розрізняються по фенотипическим і функ- національним характеристикам (Zhao ZG et al., 2007).

Суспензію КМ виділяли за допомогою стернальной пункції і висівали на культуральне пластиковий посуд (Sarstedt, Герма- ня) в середовищі культивування схМЕМ (HyClone, Нова Зеландія). Через 48 год виробляли відмивання адгезивной фракції кісткового мозку від формених елементів крові за допомогою фізіологічного рас твора натрію хлориду (0,9% NaCI, ВАТ «Біосинтез» Росія). ММСК культивували в монослое при + 37 ° С і 5% СО 2 , кожні три доби замінюючи живильне середовище. Пересівання культури до кріоконсервування виробляли по досягненні 100% конфлю- ентності за допомогою 0,25% розчину трипсину в ЕДТА (HyClone, Нова Зеландія).

На третьому пасажі (Р3) культуру ММСК кріоконсервіровачи. Для цього клітини знімали з пластика розчином трипсину і ЕДТА, центрифугували протягом 5 хв при 300 g і ресуспенді- ровали в середовищі культивування з додаванням в пропорції 1: 1 20% розчину кріопротектори - диметилсульфоксида (Bright-Line, США) на аутоси-

воротке. Потім кріовіали з суспензією поміщали в пари рідкого азоту (близько -80 ° С).

Після кріоконсервації одну з кріовіал з клітинної суспен- зией (ампулу-супутник, що містить 2 млн. Клітин) розморожували при кімнатній температурі, розбавляли її вміст 2-3 мл куль- натуральній середовища і центрифугували 5 хв при 300 g. Клітини в ко лічестве 1 млн. Висівали на культуральний пластик, після чого культивували в стандартних умовах по наступною схемою: пере- Сєви виробляли через кожні 48-72 години, після кожного виробляли підрахунок клітин в гемоцітометре (Bright-Line, США) . Всього проводилося чотири пересіву ММСК після розморожування, то є клітини вели в культурі до сьомого пасажу (P7). Термін «пасаж» вживається тут як синонім пересіву культури через рівні часові інтервали поза залежності від приросту популяції.

Для найбільш повної характеристики культур ММСК після кріоконсервації їх піддавали на третьому або на четвертому пас- сажі спрямованої диференціювання в Остеогенні, хондроген- ном і адіпоцітарном напрямках. Для індукції диференціювання ровки ММСК використовували опубліковані протоколи і соответ- ствующие коктейлі ростових факторів і Морфогенія. У всіх випадках обробка індукторами диференціювання тривала 2 неде- чи, половину середовища культивування міняли кожні 3 доби.

Морфологічні зміни після диференціювань оціни вали візуально за допомогою мікроскопа (Leica, Німеччина). У по- нейшем автори не проводили специфічних забарвлень, а судили про диференціювання клітин по їх морфології.

Фенотипування зразків кісткового мозку і ММСК людини проводили методом проточної цитофлуориметрії на проточному цитофлуориметрії FACSscan (Beckton Dickinson, США). Зразки кісткового мозку характеризували по утриманню в них гемопоетіче- ських стовбурових клітин (CD34 + / CD45 +) і кількості CD71 + клітин; ММСК характеризували на третьому пасажі перед кріоконсервіруванием по «позитивним маркерами» CD90 і CD106, по «негативним маркерами» CD45 і CD34, а число імовірно проліферіру- чих клітин в культурі оцінювали фарбуванням клітин антитіла- ми проти маркера CD71 (всі антитіла виробництва Beckton Dickinson, США). Фенотипування проводили за стандартними протоколами фірми-виробника.

Аналіз залежності проліферації ММСК від статі донора був оцінений за допомогою парного F-критерію Фішера, оскільки напів ченние дані підпорядковувалися нормальному розподілу.

Залежність проліферації клітин від віку донора оціни валась за допомогою множинного регресійного аналізу для виявлення можливих кореляцій; відмінності в проліферації ММСК у вікових груп були оцінені за критерієм Краскела- Уолліса для розподілів, що мають відхилення від нормального. Залежність проліферативної активності ММСК від частки CD71 + клітин у зразках кісткового мозку оцінювалася по результа- там множинного регресійного аналізу, відмінності в групах з
різним вмістом CD71 + клітин оцінювалися по t-критерієм Стьюдента.

Залежність проліферації ММСК від присутності в попул ції CD71 + клітин, а також порівняння проліферативної динаміки ММСК до і після кріоконсервування, було проведено тестом Краскела-Уолліса.

В результаті, після кріоконсервації та подальшого размо- ражівання все без винятку культури ММСК успішно диф- ференціювались в ортодоксальних напрямках, а саме, в Остеогенні, хондрогенном і адіпоцітарном.

Загальний розкид коефіцієнтів приросту різних попул ций ММСК незалежно від пасажу після кріоконсервації соста- вил в абсолютних цифрах від 0,72 до 5,1 за дві доби.

За результатами дослідження залежність проліферації ММСК після кріоконсервації від віку донора, від статі донора, від частки CD71 клітин в кістковому мозку донора, а також від CD71- статусу ММСК на третьому пасажі перед кріоконсервації отсут- ствовала. Результати дослідження вказують на те, що проліфера- тивная активність ММСК НЕ знижується аж до семідесятілетне- го віку. Відсутність залежності проліферації ММСК від частки CD71 + клітин, присутніх в кістковому мозку донора, дозволяє засумніватися в тому, що CD71 є маркером пролиферирующих клітин і не відображає реальної проліферації культури ММСК.

За літературними даними, у експериментальних тварин при необмежених можливостях підбору вікових груп встановлено чітке зниження здатності до адгезії до культу- ральному пластику і проліферативної активності ММСК, ви- ділених з кісткового мозку молодих і старих тварин (Kretlow JD et al., 2008; Tokalov SV et al., 2007), а також змен- шення терапевтичного потенціалу клітин, що було продемон-

стрировать на моделі інфаркту міокарда у щурів. При цьому показано, що зниження проліферативної активності ММСК in vitro є прямим показником зниження їх регенераційних здібностей in vivo (Zhang H. et al., 2005).

Для ММСК людини показано, що зі збільшенням віку до- нора знижується їх проліферативна активність і здатність формувати колонії при ізоляції з кісткового мозку (Stolzing A. et al., 2008).

2.5 Стовбурові клітини ембріо- фето-пуповіно- плацентарно-амниотического комплексу

В останнє десятиліття інтенсивно розвивається новий напрямок в медицині - клітинна і тканинна трансплантація і терапія - застосування біопрепаратів з тканин і клітин ембріо- фето-пуповинної-плацентарно-амниотического комплексу (ЕФП- ПАК) (Sun T., Ma QH., 2013).

Технології кріоконсервування дозволяють зберегти жиз- нездатність і функціональну активність біологічних об'єк тів після відігрівання, що забезпечує високу клінічну ефек тивність після їх застосування. Механізм дії жізнеспособнимі препаратів заснований на збереженні після відігрівання повно- цінності клітин і тканин і що містяться в них біологічно ак- тивних речовин природного походження, що володіють роз- нонаправленним фармакологічною дією. Перевагою застосування клітинних і тканинних біопрепаратів є те, що пацієнт отримує ряд біологічно активних, збалансованих з'єднань природного походження, здатних впливати на різні сторони метаболізму цілісного організму, а також клітини, здатні виконувати замісні функції.

Тканини ЕФППАК містять велику кількість різних ак тіваторов регенерації і диференціювання: фактор росту фіб- робластов, фактор росту нервових волокон, фактор, стімулірую- щий зростання макрофагальні і еритроїдних колоній, а також анти- проліферативні цитокіни, що запобігають клітинну і си- стемную гіперстимуляцію.

Трансплантовані фетальні клітини і їх асоціати прак- тично не викликають імунної реакції відторгнення, оскільки в 1 і 2 триместрах гестації на них не експресувати білки гісто- сумісності 1 і 2 класу. Особливість метаболізму фетальних клітин забезпечує їх більш високу стійкість до різних несприятливих факторів.

Усі пропоновані біопрепарати:

- зберігаються в низькотемпературному банку біологічних обьектов;
- проходять перевірку:
- на відсутність бактеріального і мікологічного забруднення;
- на інфікованість:
- сифіліс,
- токсоплазмозом,
- вірусами гепатиту В і С,
- ВІЛ,
- цитомегаловірусом,
- вірусом краснухи,
- герпесу.

Чистота біопрепаратів забезпечується бактеріологічними дослідженнями на аеробне і анаеробне інфекцію. Тестірова- ня проводиться імуноферментними методами і методом полі- меразной ланцюгової реакції. Кожен, підготовлений для викования біопрепарат має паспорт, що засвідчує безпеку трансплантаційного матеріалу для реципієнта, куди заносять ре- зультати перевірки.

Загальним обмеженням для застосування препаратів з клітин і тканин ЕФППАК є наявність онкологічних захворювань. Винятком є гемопоетичні клітини, що використовуються в комплексі лікування онкологічних хворих в якості засобу, що відновлює кровотворення.

Кожен біопрепарат поміщається в спеціальний герметичний контейнер, що має відповідну маркіровку і паспорт, і зберігається при температурі рідкого азоту (-196 про З). Перед использо- ванием трансплантат піддають процедурі відігрівання з дотриманням правил асептики і антисептики при температурі + 37- + 40 про С.

Всім пацієнтам після тканинної і клітинної трансплантації і терапії рекомендований щадний режим, обмеження фізичної та психоемоційного навантаження, молочно-рослинна дієта (стіл №15) протягом 10 днів, якщо немає інших обмежень.

В даний час до використання в клінічних дослід ваниях дозволені тільки стовбурові клітини кісткового мозку людини і стовбурові клітини пуповинної крові людини.

Залежно від джерела клітинного матеріалу, клітинна терапія може бути:

- аутогенного (використання власних клітин пацієнта);

- алогенних (використання донорських клітин тварин того ж виду);

- ксеногенної (використання клітин тварин інших вказаних видів).

Застосування клітинної терапії в Росії - процес неоднозначний; фундаментальних організацій, що працюють в цій обла- сті, небагато. В основному застосування клітинної терапії в нашій країні обмежена окремою медичною технологією або мето- дикою, зареєстрованої у відповідній інстанції, і ви- даної як дозволу клінічного учрежденію- заявнику на обмежений термін (наприклад, на рік). Це означає, що застосування стовбурових клітин цією організацією можливо в рамках заявленої методики і строго для лікування вказаного виду захворювання. Мова, безумовно, йде про застосування власних клітинних компонентів пацієнта або кровного донора. при наличності необхідної документації, комерційне використання клеточної терапії в цьому випадку допустимо.

У деяких НДІ та інших державних установах па- цієнт можуть запропонувати лікування за допомогою клітинних техно- логій в рамках обмежених клінічних випробувань, також в межах заявленої методики і лікування конкретного захворювання. Однак такі роботи проводяться рідко. Як правило, в цих випад- ях лікування безкоштовно для пацієнта-добровольця.

Клітинна культура, яка використовується для пересадок, повинна бути гетерогенна, тобто містити і стовбурові, і дифференціруючі- еся клітини. Клітинний матеріал може вводитися:

- внутрішньовенно;
- внутрішньом'язово;
- внутрисуставно;
- підшкірно;
- у вигляді аплікацій, в залежності від методу лікування та характеру захворювання. Використання стовбурових клітин не є панацеєю. так, наприклад, їх застосування в онкології НЕ призводить до лікуванню від раку. Однак з'являються сучасні протоколи, спрямовані на реабілітацію хворих в період ремісії і перерв між курей самі хіміотерапії. Хворі, які застосовують такий курс, здатні краще переносити основне лікування, зменшується кількість ускладнень, з'являється можливість повторити процедури хіміо- терапії раніше.

2.6. Алогенних гемопоетичні стовбурові клітини пуповинної крові

Великий інтерес до пуповинної крові, що виник в останнє десятиліття, обумовлений особливостями її клітинного складу. Уже в 70-х роках XX століття було відомо, що дана середу з- тримає більшу кількість клітин-попередників, по порівняй нію з периферичної кров'ю дітей і дорослих. Серед клітин попередників виділяють стовбурові клітини - найменш зрілі, що відносяться до тривало живуть популяціям і здатні під- тримувати свою чисельність за рахунок проліферації, а також проге- ніторние клітини - коротко живуть, швидко дифференціруюшіе- ся і дають початок функціонально активним клітинам крові та імунної системи. Прогеніторні клітини забезпечують швидке відновлення імунної функції в організмі реципієнта після мієлоаблації, а стовбурові клітини відповідальні за формування всієї самоподдерживающейся кровотворної системи.

Заготівля і використання гемопоетичних стовбурових клітин пуповинної крові для пересадок має цілий ряд переваг перед іншими джерелами кровотворної тканини. Перш за все, відсутня загроза заподіяння шкоди здоров'ю матері і дитини. Крім того, під час її заготівлі не потрібно загальна анестезія, а ризик передачі деяких латентних інфекцій значно нижче, ніж при використанні кісткового мозку або периферичних стовбурових клітин дорослих донорів. З'являється практично необмежена можливість тривалого зберігання гемопоетичних ПК в замо- Рожен стані, що дозволяє накопичувати і зберігати раз- особисті HLA-типи клітин, в той час як потенційні донори кісткового мозку з часом вибувають з Реєстру за різними причинам. Заморожені зразки, що знаходяться в банках пуповинної крові, можуть надаватися на вимогу в будь-який центр транс- плантації, що усуне затримки, які нерідко виникають через утрудненого пошуку донора і заготовки кісткового мозку.

Разом з тим, основним недоліком пуповинної крові, як джерела стовбурових клітин, є її початково мала кількість і неможливість проведення повторного забору, тому і загальна кількість стовбурових клітин, отриманих з неї, порівняй тельно невелика.

Проведені в нашій країні і за кордоном дослідження показучи, що обсяг пуповинної крові залежить від безлічі факторів: сро- ка гестації, при якому проводиться розродження, ваги плоду і плаценти, характеру патології, яка ускладнює перебіг вагітності, способу роз-

родження і, нарешті, методики збору крові. Перед проведенням збору пуповинної крові, незалежно від кінцевої його мети, необхідно отримати згоду вагітної жінки. Тщатель- але вивчається соматический, акушерсько-гінекологічний і сімейний анамнез вагітної для виявлення можливих генетичних по- шений і інфекційних захворювань, що передаються гематогенним шляхом. Кожну вагітну обов'язково обстежують на носійство HBS-Ag, наявність антитіл до збудників гепатиту С, ВІЛ-інфекції, сифілісу, Т-клітинного лейкозу людини і цитомегаловірусної інфекції . При виявленні позитивних серологічних реакцій у вагітної забір пуповинної крові НЕ проводиться.

Збір пуповинної крові здійснюється після народження дитинука і відділення його від посліду, при цьому велике значення має час накладення затискачів на пуповину. У ряді робіт було доведено, що якщо пуповина клеммируется пізніше 30 з після народження дитинука, то обсяг одержуваної крові зменшується практично вдвічі. Італійські вчені отримали цікаві дані про позитивний вплив раннього приміщення новонародженого на живіт матері при мимовільних пологах на збільшення обсягу пуповинної крові, що, по всій видимості, пов'язано з підвищенням внутрішньочеревного тиску.

Існують відкритий і закритий способи збору пуповинної крові. При відкритому способі кров збирається в стерильну ем- кістка самопливом, після обробки кінцевого ділянки пуповини дезинфікуючим розчином. Обсяг зібраної у такий спосіб крові виявляється істотно більшим, ніж при зборі закритим способом, оскільки кров надходить у ємність одночасно з артерій і вени пуповини, що мають великий діаметр. Однак при такому способі забору ризик мікробної контамінації вагінальної флорою становить 20-30%, що на порядок вище, ніж при закритому способі.

Більшість авторів сходяться на думці, що оптимальним є закритий спосіб збору пуповинної крові, що зводить ризик бактеріальної контамінації до 1-2%. В даний час для сбо- ра пуповинної крові використовують спеціальні закриті трансфу- Зіон системи, що містять антикоагулянт і оснащені дре- ційний голкою, або шприци об'ємом 50 мл, частково заповнені антикоагулянтом. Збір крові в трансфузійної систему здійс- нюється шляхом дренування голкою, самопливом, тоді як при зборі шприцом має місце активна ексфузії і негативний тиск, що створюється поршнем шприца, може надавати було пошкоджено ждающего дію на клітини крові. Іншим недоліком шпріце- вого методу є необхідність повторної пункції після запов- не-

ння першого шприца, що підвищує ризик мікробної конта- мінації, подовжує час процедури і створює певні не- зручності медичного персоналу, особливо в разі кесаревого розтину. Проте, при дотриманні всіх правил асептики і антисептики цей метод досить ефективний і безпечний і з успіхом застосовується в ряді установ, оскільки дозволяє по- лучити більший обсяг крові в порівнянні зі збором в трансфу- Зіон системи.

З наявних на сьогоднішній день антикоагулянтів предпо- чтительно використання CPDA, що складається з цитрату і фосфату натрію, глюкози і аденіну. CPDA забезпечує не тільки анти- коагуляцію, але і має протективний дію відносно клітинних мембран в процесі обробки і розділення крові на ті чи інші компоненти. Однак можливе застосування і інших ан- тікоагулянтов, таких, як цитрат-фосфат-декстроза, кислотний- цитрат-декстроза або Глюгіцир.

Збір пуповинної крові може проводитися при самопродовільно пологах і кесаревому розтині як до, так і після відділі- ня посліду. При зборі до відділення посліду процедура дещо спрощується, проте у всіх випадках слід пам'ятати про те, щоб контейнер, в який збирається кров, перебував на 50-80 см ні- ж рівня положення породіллі для того, щоб кров самопроіз- вільно надходила в контейнер під дією сили тяжіння.

Методи антисептичної обробки однакові незалежно від умов збору: пупковий канатик ретельно обробляють протягом 8-12 см в місці передбачуваної пункції 5% настой- кой йоду і 70% розчином етилового спирту або «Октенісепту». Після цього пунктируют вену пупкового канатика. Відень пуповини має большие діаметр, ніж артерії, що легко визначається візу- ально. Вся процедура збору зазвичай триває від 3 до 10 хвилин. При настанні знекровлення плаценти, про який можна судити по припиненню струму крові і спадання вени, пункційну голку видаляють і закривають захисним ковпачком.

При правильному виконанні техніки збору середній обсяг пуповинної крові становить, як правило, 80-100 мл. За даними літератури, обсяг одержуваної крові може залежати від багатьох факторів, таких, як маса тіла новонародженого, час пере- ня пуповини, термін вагітності, довжина пуповини. Однак у дослідженнях проходженні, проведеному російськими авторами, не виявлено за- лежно обсягу зібраної крові від маси плоду. З іншого сто рони, якщо низька маса новонародженого обумовлена патологією фетоплацентарного комплексу або пуповини, важкими осложне- нями вагітності, то збір пуповин-

ної крові може виявитися утрудненим або взагалі неможливим. Тому при необхід- мости прогнозування, слід більшою мірою спиратися на клінічні і лабораторні дані обстеження вагітної.

Важливими фактором, що впливає на обсяг збору пуповинної крові, є час відділення дитини від пуповини і рівень, на якому вона перетинається. Раннє відділення дитини від посліду, так само як і накладення затискачів на пуповину на максимально бліз- кому відстані до дитини, не тягне за собою будь-яких отрица- тільних наслідків для новонародженого. Тому, якщо немає аку- шерських або неонатальних показань для витримки більш дли- тільних термінів, акушерська тактика може враховувати інтереси персоналу, що проводить збір пуповинної крові, і виробляти перев'язку пуповини відразу після народження немовляти.

2.7. Гемопоетичні стовбурові клітини зрілої плаценти людини

В даний час лише частина пацієнтів, які потребують трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин, має мож ливість отримати імунологічно сумісний матеріал. Ис- джерелами гемопоетичних стовбурових клітин є кістковий мозок, периферична і пуповинна кров. Хоча гемопоетичні стовбурові клітини пуповинної крові мають багато переваг, їх кількість в доступному обсязі пуповинної крові недостатньо для трансплантації дорослій людині. У даній роботі автори повідомили, що тканину зрілої плаценти людини містить велику кількість гемопоетичних стовбурових клітин, що не связа- ни безпосередньо з кровообігом плода або матері. Кіль- кість цих гемопоетичних стовбурових клітин в цілій плаценті в 10 разів перевищує їх кількість в доступному обсязі пуповинної крові. Гемопоетичні стовбурові клітини, отримані зі свіжої або кріоконсервованої плаценти, диференціюються в клітини еритроїдного і мієлоїдного паростків як in vitro, так і in vivo при трансплантації імунодефіцитних мишам. Таким чином, кріоконсервована плацента може стати джерелом для заміщення пулу гемопопоетіческіх стовбурових клітин у людини.

Плацента - провізорний орган, який здійснює зв'язок між організмом матері і плодом в процесі внутрішньоутробного роз- ку. Крім виконання відомих фундаментальних функцій, плацента ссавців являє собою багатий резервуар гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК). У процесі онтогенезу відбувається міграція вогнищ гемопоезу. До те-

перішнього часу найбільш детально досліджено процеси плацентарного гемопо- Еза у мишей, який у багатьох відношеннях може служити моде- ллю кровотворення у людини.

У миші ембріональний гемопоез починається після гаструляції, коли група спеціалізованих мезодермальних клітин попередників (гемангіобластов) коммітіруется на шлях гемопо- Еза. Перші кровотворні попередники мігрують в стінку жел- точного мішка і ініціюють продукцію ембріональних «червоних кров'яних тілець». Існують дані, що дефінітивного ГСК, можна, відбуваються з іншого групи мезодермальних клітин (Jaffredo T. et al., 2005). Безліч досліджень свідчить про те, що мезенхима ділянки ембріона, що позначається як «аорта- гонади-мезонефрос» (АГМ), який обмежений дорзальной аортою і урогенітальними гребенями, є джерелом ГСК (Godin L. et al., 2002). Додатково ГСК формуються в пуповинної і вітелліно- виття артеріях. Ці ГСК, ймовірно, колонізують розвивається пе- чень, яка служить основним органом кровотворення вже в плід- ном періоді. Незважаючи на прогрес в ідентифікації ГСК в зароди- шевих органах, до сих пір мало відомо про походження різних пулів ГСК і їх відносному внесок у гемопоез. Так, до 2003 року залишалося НЕ з'ясованим, є чи клітини АГМ єдиним джерелом швидко зростаючого пулу ГСК фетальної печінки (Kumaravelu P. et al., 2002). Нові перспективи в розв'язанні цього по- проса з'явилися в зв'язку з виявленням в мишачої плаценті на середніх термінах гестації численних мультіпотентних клітин попередників і ГСК, що вказує на важливу роль плаценти в становленні гемопоезу (Alvarez-Silva M. et al., 2003; Gekas C. et al., 2005; Oteersbach K. et al., 2005). Ще в 70-е роки XX століття було показу але, що попередники В-клітин з'являються в плаценті миші перед тим як потрапити в печінку. Клітини, що володіють здатністю генеріровать В-лімфоцити, виявлялися в плаценті на стадії Е9.5, їх число досягало максимуму на Е12.5 і потім знижувався, аналогич- ву кінетику демонструвала і популяція ГСК (Gekas C. et al., 2005) . Так, до кінця внутрішньоутробного розвитку кількість ГСК в пла- центі у мишей знижується, що, можливо, є відображенням про- процесу міграції плацентарних ГСК в печінку і інші країни, що розвиваються кровотворні органи плода (тимус, селезінку і кістковий мозок). Накопичені дані дозволяють припустити, що плацента може функціонувати як орган лімфо і мієлопоез.

Для оцінки людської плаценти як потенційно можли ного джерела ГСК в процесі природного гемопоезу зрілі плаценти людини були

отримані в госпіталі Альта Бейтс (Берк- чи, Каліфорнія, США) за згодою донорів. Іммуногістохіміче- ські дослідження тканин плаценти на присутність CD34 і інших маркерів ГСК (CD90, CD38, CD133) проводили на зрізах з пара- фінів блоків методом імунофлюоресценції після обробки протеиназой К.

На першому етапі проводили перфузію плацент через артерії і вену пупкового канатика розчином антикоагулянту і сосудорас- Ширяєв агента. Далі, для виділення клітин, в артеріальний русло вводили 50 мл фізіологічного розчину на фосфатному буфері з антибіотиками (пеніцилін, стрептоміцин і фунгізон), протеазами (діспаза - 2,5 од. / Мл), трипсин - 0,5 мг / мл) і ЕДТА. Зразки тканин плаценти подрібнювали і поміщали в буфер з кол лагеназой I (0,1%) і діспазой (2,5 од. / Мл) на 30 хв при + 37 ° С. По- лучанин таким чином зразки перемішували і фільтрували через фільтр з розміром пор 100 мкм протягом 5 хв.

Для отримання мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), тка- невий лизат центрифугировали при 400g протягом 15 хв, видаляли супернатант. Культивування проводили відповідно до раніше описаним протоколом (Popov B. et al., 2007).

Частина плацент кріоконсервованих за наступною схемою. Пла центи промивали 250 мл буферного розчину, потім проводили перфузію розчином суміші кріоконсерванти протягом 40 хв. Потім плаценти заморожували в морозильній камері (-80 ° С) в те- чення 12 год, після чого поміщали в рідкий азот.

Кількість CD34 + клітин в гомогенатах тканин визначали за допомогою проточного цитофлюориметрів FACScaliber (BD Bioscences, San Jose, CA) з використанням Procount Progenitor Cell Enumeration Kit (BD Bioscences). Виділяли CD34 / CD45 положи- тільну популяцію клітин. Життєздатність клітин визначали за допомогою ядерно-цитоплазматичного фарбування To-Pro.

Диференціювальний потенціал клітин оцінювали з вико- ристанням повної середовища MethoCult® на основі метилцелюлози (Stem Cell Technologies, Canada). Присутність клітин-ініціаторів довго тимчасово підтримуються культур визначали з використанням фидерного шару з стромальних клітин плацентарного проісхожде ня від того ж донора. Для інактивації фідера культуру обробляти вали розчином мітоміцину С (10 мкг / мл) в протягом 2 ч.

В експериментах з трансплантацією отриманих клітин використовано імунодефіцитних мишей двох ліній неопромінених NOD.Cg-

Prkdc scid II2rg tm1wjl / Szj (JaxLab Cat. №005557) і цілком про- отриманих (2,5 Gy) NOD.Cg-Rag1 tm1mom Prf tm1Sdz / Sz (JaxLab Cat.

№004848). Всім мишам внутрішньоочеревинно вводили 10 6 ядросодер- жащих клітин, виділених з плацентарних тканин. Через 2-3 місяців Підців після трансплантації тварин виводили з досвіду і произво- дили іммуноокрашіваніе клітин крові, кісткового мозку і селезінки антитілами до людським CD45 (загальний лейкоцитарний маркер), CD3 (лімфоцитарний маркер), CD25 (лимфоцитарно / моноцитарний маркер) і CD51 / CD61 (маркери тромбоцитів / мегакариоцитов). Під- рахунок клітин проводили з допомогою проточній цитометрії з використан- ням відповідних негативних (миші без трансплантації) і позитивних контролів (людська кров).

В даний час основними джерелами ГСК для транс- плантації в клінічній практиці служать кістковий мозок, періфе річеская і пуповинна кров. Але потреба в HLA-сумісних стовбурових і прогеніторних кровотворних клітинах перевищує можливість по їх заготівлі. Менш ніж 30% потенційних ре- ціпієнтов мають HLA-ідентичних родичів, у зв'язку з чим широко поширеною є пересадка алогенних ГСК кісткового мозку, яка часто призводить до несприятливих реакциям з боку імунної системи. Крім того, не слід забував вать і про головне обмеження використання людської пупо- винної крові для трансплантації - низький вміст в ній ГСК, недостатнє для забезпечення адекватного відновлення гемо- поезії у дорослих реципієнтів.

Результати роботи авторів з очевидністю показують, що кріоконсервування плаценти за допомогою перфузії і подальшіного заморожування може бути альтернативним і ефектив- ним способом збереження аутогенних кровотворних стовбурних клітин в кількості, достатній для реконституції гемопоезу дорослих пацієнтів (Сєріков В.Б., Куйперс Ф., 2008).

2.8. Стовбурові клітини амніону людини

Клітини, виділені зі шматочків амніотичної оболонки плаценти людини шляхом ферментативного руйнування тканини, і обладають адгезивностью до пластику, нарощували в середовищі DMEM-F12 з додаванням 10% бичачої фетальної сироватки. Отримані та- ким чином клітини мали фібробластів-подібну морфологію.

Амніон плаценти людини складається з епітеліальних клітин і сполучної тканини мезодермального походження. Фіб- робласто-поді-

бні клітини амніону людини мають іммунофено- тип, схожий з мезенхімальних клітинами кісткового мозку. Ці дані дозволяють зробити висновок, що культивовані клітини амніону людини є мезенхімальних клітинами.

Експресія маркерів поверхні була вивчена на різних пас- сажах мезенхімальних клітин амніону. Виявилося, що значущих змін в експресії поверхневих маркерів НЕ спостерігалося до 10 пасажу. Винятком стала експресія МНС I класу, яка монотонно зростала від пасажу до пасажу. Імунофенотип клітин амніону виглядає наступним чином: CD54hi-CD44hi-CD90dim- HLA-ABClo-HLA-DR-CD34-.

З метою оцінити проліферативні властивості мезенхімальних клітин амніону в культурі і проаналізувати їх здатність до диференціювання визначено рівні експресії таких внутрікле- точних білків як нестін, що характеризує нативное, недіффе- ренцированное стан клітин, і Ki67, який є марке- ром інтенсивно діляться клітин. Виявилося, що в популяції досліджуваних клітин міститься близько 50% нестін-позитивних і 70% Ki67-позитивних клітин. Це говорить про те, що більшість досліджуваних клітин не диференційовані і проліферують.

Основним критерієм «стовбурові» клітин служить їх спосібність диференціюватися в клітини різних зародкових листків. З метою визначити, чи є мезенхімальні клітини амніону людини стовбуровими, вивчили їх здатність диффференціроваться в клітини мезодермального походження - остеоцитів і адіпо- ціти, а також ектодермального походження - нервові клітини і ентодермального походження - гепатоцити.

Умовами адіпогенних диференціювання були наявність в середовищі культивування дексаметазону, індометацину, інсуліну і IBMX, а також 100% конфлюентних клітин перед додаванням диффференцировочной середовища. Через 3 тижні інкубації клітин в такому середовищі, з її зміною кожні 3 дні, в клітинах почали накопичувати тися жирові вакуолі, кількість і розмір яких до кінця 4-го тижня помітно збільшувалися.

У разі остеогенной диференціювання середовище для культивування вання була доповнена β-гліцерофосфатом, дексаметазоном і фосфатом аскорбінової кислоти. Інкубація клітин в диффферен- ціровочной середовищі протягом 4 тижнів привела до збільшення експрес в клітинах амніону маркерних білків остеоцитів - остео нектин і кісткового сіалірованние білка. Також була зарегистри- рована актива-

ція лужноїфосфатази, ферменту, активність ко торого підвищена в остеоцитах.

Для диференціювання клітин амніону людини в гепатоці- ти була використана середовище, що містить ростові фактори HGF і OSM, а також інсулін, трансферин і дексаметазон. Через 4 тижні інкубації клітини були проаналізовані на експресії цю альбуміну та α-фетопротеїну. Було виявлено значної ве збільшення експресії альбуміну в клітинах, культівіро- ванних в дифференцировочной середовищі, по порівнянні з контроль- ними клітинами. Однак в супернатанті клітин альбуміну обна- ружено не було, що говорить про відсутність або слабку секреції цього білка.

Для перевірки здатності клітин амніону людини діффе- ренціюватися в нервові клітини була використане середовище, допол- ненная набором нейротрофних і ростових факторів і гормонами (ретиноевая кислота, bFGF, EGF, NGF, NT-3, інсулін, гідрокорті- зон, прогестерон). Інкубація клітин амніону людини протягом 1 тижня привела до помітного зниження рівня експресії нестін і збільшення експресії GFAP і pill-тубуліну - характерних бел ков нервових клітин.

Отримані результати свідчать про здатність кле- струм амниона людини в певних умовах дифференціротися в клітини різного походження і дозволяють заклю чить, що отримані клітини амніотичної оболонки плаценти є мультипотентними стовбуровими клітинами, а амніотіче- ська оболонка плаценти людини - альтернативним джерелом МСК (Холоденко І.В. та ін., 2007).

Протягом декількох останніх років частина досліджень була спрямована на пошуки альтернативних кістковому мозку, більш доступні джерел клітин, що володіють «стовбурові» і при- придатних для регенеративної медицини. Такими джерелами є- ються екстраембріональні органи, а саме: пуповина, плацента, амніотична оболонка, амніотична рідина.

Для перевірки здатності клітин амніону людини діффе- ренціюватися в різні типи нервових клітин in vitro, фіб- робластоподобние клітини амніону людини культивували в сре- дах двох видів. Одне середовище представляла собою набір хімічних реагентів (ДМСО, 2-меркаптоетанол, KCl) - так звана «хі-мическая» диференціювання. Друга середа була доповнена цілим набором нейротрофних і ростових факторів і гормонами (реті- Ноїв кислота, bFGF, EGF, NGF, NT-3, інсулін, гідрокортизон, прогестерон) - фактор-индуцируемая диференціювання.

В результаті «хімічної» диференціювання клітин амніону людини протягом доби більша частина клітин гинула. Однак решта клітин зазнавала істотних морфологі- етичні зміни, а саме: з'являлося безліч відростків, морфологія клітин була подібна морфології клітин астроглії. Крім того, в цих клітинах істотно знижувався рівень експрес нестін в порівнянні з контрольними клітинами, культі- віруемимі в стандартних умовах. З іншого боку, ці клітини починали експресувати на досить високому рівні гліаль- ний фібрилярний кислий білок (GFAP), що не характерно для тих же клітин, що ростуть в звичайних умовах.

Питання до лекції:

1) Стадії розвитку зародку.
2) Ембріобласт і трофобласт.
3) Ембріональні зачатки.
4) Поняття про стовбурової клітини.
5) Ієрархія, класифікація стовбурових клітин.
6) Ембріональні стовбурові клітини, отримання з бластоцисти.
7) Ембріональні стовбурові клітини, особливості їх культивування.
8) Властивості ембріональних стовбурових клітин.
9) Проблеми застосування ембріональних стовбурових клітин в медицині.
10) Види взаємодії клітин.
11) Поняття про ембріональну індукцію.
12) Поняття про детермінацію.
13) Поняття про диференціювання.
14) Механізми гістогенезу.
15) Молекулярно-генетичні основи диференціювання.
16) Генетична детермінованість диференціювання.
17) .Методи генетичного аналізу фенотипу клітин.
18) Методи білкового аналізу фенотипу клітин.
19) Поняття про кліткові типи.

Лекція 3 – Культивування клітин

План лекції

3.1. Культивування стромальних клітин кісткового мозку щура на коллагене I типу різного походження;

3.2. 3D-культивування: від окремих клітин до регенераційної тканини ;

3.3. Хромосомніаберації, що виникають в ембріональних стовбурових клітинах людини в процесі культивування;

3.4. Виділення і культивування гемопоетичних стовбурових клітин;

3.5. Попередня иммунокоррекция і культивування клітин кісткового мозку;

3.6. Наступність цитогенетичних характеристик в пасажах ембріональної гермінативної клітинної лінії миші G1;

Вирощувані на штучних поживних середовищах клітини і тканини рослин складають основу різноманітних технологій в сільському господарстві. Одні з них направлені на отримання ідентичних вихідній формі рослин (оздоровлення і клонального мікророзмноження на основі меристемних культур, створення штучних насіння, кріозбереження генофонду при глибокому заморожуванні меристем і клітин пилку), інші

- на створення рослин, генетично відмінних від вихідних, шляхом полегшення і прискорення традиційного селекційного процесу або створення генетичної різноманітності, пошуку і відбору генотипів з цінними ознаками.

У першому технологічному варіанті використовують штучне запліднення, культуру незрілих гібридних семяпочек і зародки, регенерацію рослин з тканин летальних гібридів, а також гаплоїдні рослини, отримані при культивуванні пиляків або мікроспор. У другому - нові форми рослин створюються на основі трансгенних рослин і мутантів, що утворюються in vitro . Таким шляхом отримані рослини, стійкі до вірусів і інших патогенів, гербіцидів; рослини, здатні синтезувати токсини, патогенні для комах-шкідників; рослини з чужорідними генами, контролюючими синтез білків холодостійкості і білків з поліпшеним амінокислотним складом; рослини зі зміненим балансом фітогормонів.

Слід звернути увагу на те, що лінії ЕСК людини і ембріональні гермінативні клітинні лінії G 1 з статевого горбка 12,5-денного ембріона мишей BALB / c, підтримувані in vitro тривалий час (15-75 пасажів), схильні до генетичним і епігенетичні змін, які , очевидно, обумовлені адаптацією клітин до зростання в культуральних умовах в недиференційованому стані, а значить, потребують ретельного геномном моніторингу як під час культивування, так і в детальному аналізі при використанні in vivo і в клінічних цілях. Застосування ліній ЕСК для модельних фармакологічних експериментів, преклинических і клінічних випробувань в майбутньому передбачає використання для цих цілей клітин, що пройшли мінімальну кількість пасажів в культурі (Меліхова В.С., 2005).

3.1. Культивування стромальних клітин кісткового мозку щура на коллагене I типу різного походження

Колаген є фібрилярні білком, одним з компонентів міжклітинної матриксу. В даний час відомо 27 різних генетичних типів колагену, з них 4 фібріллообразующіх, на які припадає 95% загальної кількості колагену в організмі (Ruggiero F. et al., 2005). Білками, забезпечують механічну міцність всіх тканин ссавців, є фібріллообразующіе колаген типів I, II, III і V, з яких 90% припадає на колаген типу I. Завдяки своєму унікальному і дуже консервативному амінокислотним складом, колаген мало імуногенний і тому при введенні під шкіру практично не викликає імунної відповіді. Крім того, колаген є відмінним гемостатик. Все це робить колаген матеріалом, широко застосовуваним в медицині і біотехнології. Унікальність генового гелю в якості субстрату полягає в тому, що структура молекули фибриллярного колагену настільки пристосована до його фібріллообразующей функції, що розчин колагену дає нативную фибриллу спонтанно in vitro при приведенні системи до фізіологічних умов.

Препарати колагену отримують з шкур вівці або молодих биків методом лужно-сольовий екстракції. Здатність колагену до фібріллообразованію залежить від способу отримання колагену. Існують три основні способи отримання колагену I типу: кислотна, ферментативна та лужно-сольова екстракції. Всі вони дають нативную, тобто трехспіральную молекулу білка.

Колаген I типу широко застосовується в медицині і біотехнології в зв'язку з відносною простотою отримання і своїми біологічними властивостями. На різних молекулярних і фібрилярних колагенових

субстратах на площині і при тривимірному культивуванні в гелях колагену вивчається проліферація (індекс проліферації), распластиваніе (актинового цитоскелет, площа распластиванія) і остеогенна диференціювання (наявність внутрішньоклітинної лужноїфосфатази) стромальних клітин кісткового мозку для застосування в замісної клітинної терапії в якості носія стромальних стовбурових клітин.

В даний час препарати колагену I типу та його різні комбінації з іншими остеотропними препаратами активно використовуються при кістковій пластиці в травматології та ортопедії, щелепно-лицевої хірургії і стоматології (Friedmann A. et al., 2002; Wahl DA et al., 2002).

В останні десятиліття інтенсивно розвивається новий напрямок біотехнології - тканинна інженерія, тобто створення з клітин і матриксу композицій, призначених для відновлення тканин. Початком цього напрямку служить робота Е. Белла з співробітниками по включенню в колагеновий гель дермальних фібробластів, які живуть, розмножуються і перебудовують структуру гелю. Надалі на основі генового гелю були отримані еквіваленти практично всіх тканин організму.

Колаген використовують також при двомірному культивуванні клітин в якості субстрату. У цьому випадку можливе використання як фибриллярного, так і молекулярного колагену. При цьому поведінка клітин на цих різновидах генового субстрату істотно відрізняється. Зокрема, від структури нанесеного на підкладку колагену залежать форма і організація актинового цитоскелету у культивованих фібробластів

3.2. 3D-культивування: від окремих клітин до регенераційної тканини

Феномену епітелію-мезенхимальной пластичності мультіпотентних мезенхімальних стромальних клітин, що спостерігається в 2D культурах, до сих пір не знайдено задовільного пояснення. Нові можливості відкриває 3D культивування ММСК, яке моделює закономірності освіти шарів епітеліальних клітин (ламинацию). Аналіз літературних даних дозволяє припустити, що саме спонтанне формування ММСК-сфероидов індукує утворення регенераційної («бластемной») тканини в фетальних і дорослих органах при пошкодженні. Існує можливість репрограммірованія щільних сфероидов ММСК в нейроектодерми і примітивну ентодерму (Рєпін ВС та ін., 2008; Сабурін І.М. та ін., 2009 2010).

3.3. Хромосомніаберації, що виникають в ембріональних стовбурових клітинах людини в процесі культивування

При культивуванні ембріональних стовбурових клітин людини необхідно проводити постійний моніторинг їх каріотипу, оскільки в процесі культивування in vitro в ЕСК нерідко виникають хромосомні аберації (Прохорович М.А. та ін., 2007; Draper J. et al., 2004; Inzunza J. et al., 2004; Maitra A. et al., 2005; Baker DE et al., 2007; Josephson R., 2007), такі як анеуплоїдії - втрати або, навпаки, придбання зайвих хромосом в диплоидном хромосомному наборі, і структурні перебудови. Подібні зміни геному клітини можуть впливати на її проліферацію як у бік посилення, так і придушення, на здатність до спонтанної диференціювання в тому чи іншому напрямку, а також приводити до злоякісної трансформації. З цієї причини зміни каріотипу ЕСК знижують відтворюваність і достовірність результатів наукових експериментів внаслідок численних артефактів, які є серйозною перешкодою для застосування ЕСК в клінічній практиці (Josephson R., 2007). До теперішнього часу відомо про виникнення таких хромосомних аномалій при культивуванні ЕСК, як поява в геномі зайвих 12, 17 і X хромосом (Josephson R. et al., 2006; Baker DE et al., 2007).

У грудні 2008 року в журналі Nature Biotechnology з'явилися дві роботи незалежних груп дослідників, де показано, що набір хромосомнихаберацій, що відбуваються в ЕСК людини при культивуванні, трохи ширше вже відомого. При цьому дослідники не стали обмежуватися загальноприйнятою забарвленням препаратів метафазних пластинок по Гімза, що застосовується для обліку хромосомних аберацій, оскільки цей метод не володіє достатньою точністю. Крім стандартного методу використовували аналіз одиничних нуклеотидних поліморфізмів (SNP - аналіз від single nucleotide polymorphysm), заснований на мікрочіповой технології (Maitra A. et al., 2005), проведело порівняльну геномну гібридизацію. Результати підтверджені флуоресцентної гибридизацией in situ (FISH). Також оцененівалось вплив хромосомних аберацій на експресію геному за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (qRT-PCR) (Григорян А.С., 2009У).

Наукова група C. Spits охарактеризувала сімнадцять ліній ембріональних стовбурових клітин людини, отриманих у власній лабораторії за відомою методикою (Mateizel I. et al., 2006) і культи-

вованих різне число пасажів. Найменше число пасажів, на якому здійснено аналіз, - 5, найбільше - 276.

У культивували лініях виявлено три типи хромосомних аномалій: трисомії або моносомии по хромосомах 22, 18 і 17 (тільки в одній лінії) (1); субмикроскопические дуплікації (дуплікації ділянок хромосом, що не виявляються забарвленням по Гімза) (2); поява в клітинах гібридної хромосоми, що включає коротке плече хромосоми 18, її центромерного ділянку і довге плече хромосоми 5 або 7 (Maitra A. et al., 2005).

Найбільш часто серед зустрілися субмикроскопических дуплікацій, які виявилися в п'яти лініях ембріональних стовбурових клітин після тривалого культивування (більш ніж 100 пасажів), відзначалася Дуплікація локусу 20q11.21. Ця аномалія колись була описана для двох ліній ембріональних стовбурових клітин - H7 і HSF1, проте їй не надавали великого значення, вважаючи цю аномалію характерною тільки для конкретних клітинних ліній (Maitra A. et al., 2005; Wua H. et al., 2008). Група C. Spits показала, що дана мутація має в різних випадках різну протяжність і може зачіпати ген DNMT3B , продукт якого бере участь в проліферації клітин і захищає ЕСК від апоптозу.

Збільшення кількості білка DNMT3B в клітинах з сталася дуплікацією призводило до того, що клітини починали активніше пролиферировать, а також були в меншій мірі схильні до спонтанної диференціювання, зазвичай спостерігається по краях колоній ЕСК. Іншими генами, які могли піддаватися дуплікації, виявилися відомий регулятор самооновлення ЕСК Sox-2 і протоонкоген c-Мус (Григорян А.С., 2009У).

Дослідники під керівництвом AL Perrier зосередилися на вивченні дуплікації локусу 20q11.21, що включає до 23 генів і мікроРНК hsa-miR -1825, проаналізувавши п'ять ліній ембріональних стовбурових клітин людини. При цьому каріотип клітин оцінювався на кожному пасажі до пасажу, на якому вперше визначалася дана аномалія. Для ліній ЕСК, обраних французькими вченими, раніше показаний нормальний диплоїдний каріотип (за даними регістра ембріональних стовбурових клітин NIH) (http://stemcells.nih.gov/ research/registry). Дуплікації виявлені в чотирьох лініях з п'яти на пасажах від 50 до 105. Те, що в одній лінії аномалія так і не виявилася, виключає вплив на появу дуплікації умов культивування, прийнятих в даній лабораторії. В інших чотирьох лініях ЕСК дуплікації виявлені на відповідних пасажах в 24-57% клітинах. При цьому клітини з дупліка-

цією, як підкреслюють автори роботи, не відрізнялися від нормальних клітин швидкістю проліферації і експресією характерних для ЕСК маркерних генів.

Відомо, що ампліфікація локусу 20q11.21 спостерігається при карцинома молочної залози, раку легені (Tonon G. et al., 2005), гепатоцелюлярної карциноми (Midorikawa Y. et al., 2006), раку сечового міхура (Hurst CD et al., 2004), на ранніх стадіях раку шийки матки (Scotto L. et al., 2008), а також при меланомі (Koynova DK et al., 2007). Мабуть, ця область геному містить гени, що регулюють проліферацію клітин, хоча група N. Lefort і не виявила в ембріональних стовбурових клітинах з її дуплікацією підвищення проліферативної активності. Також слід звернути особливу увагу на що міститься в регіоні 20q11.21 мікро-РНК, оскільки в даний час відомо, що мікро-РНК є ключовими регуляторами активності життєво важливих генів і задіяні в канцерогенезі (Calin GA et al., 2004).

Вчені з наукової групи C. Spits припустили, що поява описаних субмикроскопических дуплікацій і фрагмента хромосоми 18, з'єднаного з фрагментом 5 або 7 хромосоми, обумовлено порушенням механізмів репарації ДНК. У хромосомі 18 часто виникає двунітевой розрив в певній галузі (fragilesite - ділянку розриву, ламкий сайт) і відбувається втрата довгого плеча разом з теломерной ділянкою. Потім втрачений ділянку хромосоми відновлюється, однак в якості основи з якоїсь причини використовуються хромосоми 5 або 7. Такі порушення можуть бути індуковані певними умовами культивування, наприклад заміною фетальної бичачої сироватки на штучні аналоги сироватки (Lukusa T. et al., 2008). Причина, мабуть, полягає в тому, що в штучній сироватці відсутні деякі необхідні рибонуклеотиди, що призводить до порушень механізмів репарації ДНК. Щодо субмикроскопических дуплікацій автори своє припущення Ніяк не пояснюють.

Доведено, що крім вже описаних змін каріотипу для ЕСК людини характерно виникнення хромосомних аномалій, які зачіпають одночасно хромосоми 18, 5 і 7, а також дуплікації області субсегмента 20q11.21, що включає гени, продукти яких беруть участь в регуляції самооновлення і диференціювання ембріональних стовбурових клітин.

Найбільш частими є також структурні та числові аномалії хромосом 12, 17, 20 і X-ізохромосома (i12p), ізодіцентрікі, транслокації, трисомії 12, 17, 20 (Draper J. et al., 2004; Inzunza J. et al., 2004; Rosler E. et al., 2004). Цікаво, що в ЕСК миші також спостерігаються хромосомні аберації, причому в них залучаються хромосоми або хромосомні

регіони, ортологічние хромосомами людини. Так, зміни каріотипу ембріональних стовбурових клітин миші, що супроводжуються редукцією здатності колонізувати зародкову статеву лінію, часто зачіпають хромосоми 8 і 11. При цьому хромосома 11 миші має ділянку, сінтенний з довгим плечем хромосоми 17 людини. Дійсно, послідовності генів Stat3 і Grb2 , контролюючі самовідновлення і диференціювання ЕСК миші, і розташовані на хромосомі 11, у людини локалізовані в довгому плечі хромосоми 17 (17q21.31 і 17q24- q25, відповідно).

3.4. Виділення і культивування гемопоетичних стовбурових клітин

У зв'язку з пошуками нових шляхів вирішення проблеми замісної терапії з використанням стовбурових клітин увагу біологів і клініцистів привернула здатність гемопоетичних стовбурових клітин давати початок різним типам спеціалізованих соматичних клітин під впливом ряду індукують ростових факторів, а також зберігати цю здатність після тривалої кріоконсервації. Основним джерелом стовбурових клітин є кістковий мозок, здатний, на додаток до своєї основної гемопоетичних функції, генерувати попередники клітинних елементів великого числа диферонів тканин організму. Однак їх можна в різних кількостях отримати також з периферичної та пуповинної крові (Гольдберг Е.Д. і ін., 2006; Дигай А.М., Жданов В.В., 2010; Дигай А.М. та ін., 2011) .

Кількість життєздатних клітин визначається шляхом фарбування 1% розчином трипанового синього з подальшим підрахунком нефарбованих клітин в камері Горяєва. Виділення CD34 (+) і CD133 (+) клітин з мононуклеарной фракції проводять за допомогою іммуномагнітного сепаратора MiniMACS (Miltenyi Biotec).

Для культивування виділених ГСК використовуються поживні середовища RPMI1640 (Sigma), L-15 (Sigma), DMEM / F12 (Sigma) і ПСП, що містять 10% фетальної сироватки плоду корови. Крім того, ГСК культивують в середовищі RPMI 1640 року, що містить 10% фетальної сироватки плоду корови з додаванням 1,00 нг / мл Flt-3 Ligand, 100 нг / мл Stem Cell Factor, 20 нг / мл IL-3, 20 нг / мл IL-6. Клітини висівають в культуральні 24 ямкові плашки. Культивування проводять при + 37 ° С в зволоженою атмосфері, що містить 5% СО 2 . Під час культивування здійснюється щоденне мікроскопірованіе ку-

льтуральних плашок з культурою клітин за допомогою інвертованого мікроскопа.

При культивуванні CD34 (+) і CD133 (+) клітин на живильному середовищі RPMI 1640 року, що містить 10% фетальної сироватки плоду корови як з додаванням 100 нг / мл Flt-3 Ligand, 100 нг / мл Stem Cell Factor, 20 нг / мл IL -3, 20 нг / мл IL-6, так і без додавання, проліферація клітин не відзначається. Культивування ГСК з кісткового мозку людини на поживних середовищах L-

15 (Sigma), DMEM / F12 (Sigma), ПСП, що містять 10% фетальну сироватку плоду корови без додавання цитокінів, протягом 3-х тижнів культивування розмноження не супроводжується розмноженням виділених мічених клітин .. На ранніх термінах культивування спостерігається часткове прикріплення клітин на поверхні культуральної посуду, які за морфологічними ознаками подібні лімфоцитів і являють собою відносно однорідну сукупність округлих клітин. Частина клітин знаходиться в підвішеному стані і зберігає початкову форму.

При культивуванні немічених ядерні клітин, отриманих після магнітної сепарації при таких же умовах, як і при культивуванні CD34 (+) і CD133 (+) клітин, на початкових етапах відзначається поява в культуральному середовищі груп зважених клітин, що складаються з декількох десятків клітин, які на 2-3-ю добу прикріплюються до культу- ральной поверхні. На 10-ту добу культивування від центру до периферії цих колоній починається зростання фібробластоподібних клітин. Крім того, до даного терміну культивування в культурі відзначається поява великих клітин із зернистою цитоплазмою, а також клітин з ундулирующей мембраною, характерних для макрофагальні клітин. У міру культивування макрофаги зникають, а на їх місці починають рости фібробластоподібних клітини. На 13-у добу культивування число фібробластний клітин в монослое починає збільшуватися. Освіта конфлюентного моношару, що складається з фібробластоподібних клітин подовженої форми, починається до 25-денного терміну культивування.

Виділення ядерні клітин з пуповинної і периферичної крові, а також з кісткового мозку людини із застосуванням Ficoll Paque і лізуючого розчину дає можливість отримувати максимально очищені мононуклеарние фракції. Використання іммуномагнітной сепарації дозволяє виділяти вибірково гемопоетичні стовбурові клітини з фе- нотіпамі CD34 (+) і CD 133 (+) до 1% від загальної кількості мононукле-

арних клітин. Застосування живильного середовища RPMI 1640 в комплексі з ростовими факторами і цитокінами для культивування CD34 (+) і CD133 (+) клітин не приводить до активації проліферативних властивостей зазначених клітин.

3.5. Попередня іммунокоррекція і культивування клітин кісткового мозку

Відомо, що хронічні тривало перебігають захворювання (хронічний стрес) супроводжуються пригніченням міграційної активності та порушеннями популяційного складу імунорегуляторних клітин, в тому числі клітин кісткового мозку. Раніше показано, що в зв'язку з розвитком хронічної імуносупресії у таких хворих знижена терапевтична ефективність мононуклеарной фракції клітин (МФК) КМ при проведенні клітинної терапії.

У кардіохірургічних хворих (n = 20) вивчали вплив попередньої імунокорегуючої терапії та процесу культивування мононуклеарной фракції клітин кісткового мозку на зміну функціональної (міграційної) активності і фенотипова складу аутологічних клітин кісткового мозку; досліджували фенотипический склад і функціональну активність МФК з крові і кісткового мозку, узятих одночасно, без і після підготовки иммунокоррегирующая препаратами, а також МФК з кісткового мозку до і через 5 діб культивування. Попередню імунокорегуючої терапії здійснювали у хворих, якщо in vitro вихідний індекс стимуляції МФК крові був <1 (ІС <1).

Дослідження клітин крові і кісткового мозку проводили на проточному цитометрі Cytomics FC-500 фірми Becman Coulter з використанням моноклональних антитіл до CD4, CD8, В-кл, NK, Та, і CD4 / CD8. Результати цітофлюоріметріческого аналізу оброблені статистично.

Виділивши в досліджуваній групі показники, що характеризують морфогенетическое ланка імунітету (CD4, CD8), автори встановили, що у хворих без иммунокоррегирующей підготовки з кісткового мозку активно мігрують в кров не клітини, які беруть участь в морфогенетичних процесах, а клітини, що забезпечують реалізацію загальних імунних реакцій організму (По-кл, NK, Та). Підготовка хворих иммунокорректорами гальмувала вихід в кров В-кл, NK, Та з кісткового мозку, але стимулювала міграцію клітин, що беруть участь в процесах проліферації і репаративної регенерації (CD4 та CD8). У

процесі культивування аутологічних МФК кісткового мозку від хворих без імунокорекції в культурі знижувався вміст імунорегуляторних популяцій клітин (NK, В-кл і Ш). попередня імунокоригуючі підготовка також знижувала ці показники у хворих.

Таким чином, імунологічна підготовка активізує міграційну активність з кісткового мозку в кров клітин, що беруть участь переважно в процесах проліферації і репаративної регенерації (CD4, CD8, збільшується відношення CD4 / CD8). Культивування МФК кісткового мозку від хворих без попередньої імунокорекції знижує вміст в культурі клітин, які беруть участі в репаративних і проліферативних реакціях (В-кл, NK, Та), але підвищує вміст клітин регулюють відновний морфогенез (CD4, CD8) більшою мірою, ніж у хворих з иммунокоррекцией.

Більш виражена терапевтична ефективність МФК кісткового мозку у хворих після попереднього культивування та імунокорекції в порівнянні з хворими, клітини яких тільки культивувалися, обумовлена поверненням цих клітин в організм, де вже відновлена інтеграційна функція імунного статусу, за допомогою иммунокорректоров (Темнов А.А. та ін ., 2007).

3.6. Наступність цитогенетичних характеристик в пасажах ембріональної гермінативної клітинної лінії миші G1

Ембріональні гермінативні клітини (ЕГК) є нащадками прімордіальних гермінативних клітин. Ці клітини мають загальні характеристики плюріпотентності, до яких відносяться необмежена проліферація, експресія ряду маркерів ембріональних клітин, зокрема, лужної фосфатази, Oct-4, а також здатність диференціюватися в похідні всіх трьох зародкових листків (Park

JH et al., 2004). Вважається, що каріотіпическая еволюція таких ембріональних клітин під впливом умов культивування може бути однією з причин зниження плюрипотентних властивостей на більш пізніх пасажах.

У той же час, ранні події формування ліній ембріональних клітин, специфіка селекції клітинних клонів після проходження

«Кризи», типового для адаптації клітин до нових умов їх культивування in vitro , до сих пір залишаються недостатньо дослідженими в зв'язку з обмеженістю кількості клітин на цих пасажах. Важливість вивчення ранніх подій обумовлена тим, що традиційно каріотіпі-

ческій аналіз виконується на переважаючих («модальних») клітинних клонах, успішно пережили такий «криза», який не виключає присутності «мінорних» варіантів і змін їх співвідношень в процесах пассірованія клітин. Так, кариотипирование незалежно отриманих 88 ЕСК ліній мишей показало, що «нормальний» каріотип, як модальний в більшості клітин, виявляється тільки в 53 з них, причому в 52 лініях склад статевих хромосом був XY, а у однієї лінії - XX; всі інші ембріональні стовбурові клітини ліній несли різні типи цитогенетичних аномалій (Sugawara A. et al., 2006).

Для вивчення наступності каріотіпіческіх характеристик в різних пасажах ембріональних гермінативних клітин автори виконали дослідження клітинних популяцій ембріональних гермінативних клітин G1, отриманих з статевого горбка 12,5-денного ембріона миші лінії BALB / c.

В аналіз включили популяції клітин G1, отримані на 15-му і 75-му пасажах після їх виділення з статевого горбка 12,5-денного ембріона миші лінії BALB / c, а також три пасажу (35 / 14,35 / 26 і 35 / 40) сублінії G1-0A, виділеної з G1 на 35-му пасажі шляхом селекції на незалежний зростання від сироваткових факторів (1%). Для отримання метафазних пластинок клітини суспендованих і інкубували 30 хвилин в розчині KCI (0,56%) при + 37 ° C. Хромосоми фіксували сумішшю метанолу і крижаної оцтової кислоти (3: 1), тричі змінюючи фіксуючий розчин. Препарати розкопували на холодні вологі скла, висушували і фарбували барвником Гімза («Merck», Німеччина).

Пофарбовані цитогенетичні препарати аналізували за допомогою мікроскопа Carl Zeiss при збільшенні в 1000 разів. Метафазні пластинки фотографували за допомогою цифрового фотоапарата Canon (PowerShot G6, Great Britain). Індивідуальне типування хромосом проводили відповідно до даних Cowell JK (1984). Аналізували кількість хромосом і їх якісний склад; для окремих метафазних пластинок становили каріограмми. Підрахунок кількості хромосом в клітинах виконували на фотографіях метафазних пластинок.

Мінливість клітинних популяцій за кількістю хромосом характеризували за наступними показниками: меж варіювання, часткою клітин з модальним числом хромосом і шириною модального класу. У зв'язку з вираженим різноманітністю ембріональних стовбурових клітин за кількістю хромосом враховували кількість клітин (у відсотках від загальної кількості розглянутих клітин) з близькими числами хро-

мосом, які зустрічалися частіше, ніж інші, і позначали його як умовно модальное число хромосом.

Аналіз розподілу клітин за числом хромосом дозволив виявити їх широке розмаїття в усіх досліджених пасажах клітин. Клітини протягом 75 пасажів зберігали високий рівень гетерогенності за присутністю різних клонів, що відрізняються за кількістю хромосом. Спостерігалася певна перевага по представленості серед них клітин з гіперпента- і гіпогексаплоідним набором хромосом.

Найбільш гетерогенної за присутністю клітин з різним числом хромосом виявилася клітинна популяція лінії G1 самого раннього з досліджених пасажів - G1 15. У порівнянні з іншими пасажами в ній виявлялася щодо підвищена частота народження гіпергексаплоідних клітин. В пасажах сублінії G1-0A, отриманої шляхом селекції клітин на середовищі, збідненої сироватковими факторами, в порівнянні з 15-м і 75-м пасажами лінії G1, виявлялася деяка стабілізація клітин за кількістю хромосом з тенденцією до збільшення частки гіпотетраплоідних - гіпопентаплоідних клітин до 35/40-му пасажу сублінії G1-0A.

У всіх розглянутих клітинних популяціях спостерігалася висока частота центрических злиттів хромосом (робертсонівські транслокации). У вихідній лінії ЕСК G1 на 15-му пасажі вони зустрічалися з частотою 2,1 ± 0,3 на одну клітку. Чи не зменшувалася частота їх виявлення й у сублінії ОА на 14-му, 26-му і 40-му пасажах (2,2 ± 0,3; 2,2 ± 0,2 і 1,9 ± 0,2 відповідно).

Раніше висловлювалися припущення про те, що підвищена частота таких центрических злиттів може бути пов'язана з гіперплоідностью клітин (Яцишина А.П. та ін., 2004). Однак автори не виявили прямого зв'язку між числом хромосом в клітинах і присутністю робертсонівських транслокаций.

Як правило, центричні злиття спостерігалися між гетерологічними хромосомами. У гетерологічних центрических злиттях брали участь всі без винятку хромосоми; в сублінії G1-OA на 35/14-му пасажі відносно частіше, ніж інші, в таких злиттях брали участь хромосоми 5, 8, 9,10,12 і 14.

Для оцінки особливостей хромосомного складу окремі клітини кожного пасажу були каріотіпіровани. Каріотипування метафаз сублінії G1-0A на 35/14-му пасажі показало, що в більшості випадків хромосоми присутні в метафазних пластинках в 4-6 копіях, за винятком хромосом 6, 7 і 12, за якими виявляється певний дефіцит копій в порівнянні з іншими хромосомами . В щодо надмірній кількості копій

представлена хромосома 11. Подібні тенденції спостерігалися і в каріотіпірованних клітинах інших клітинних популяцій лінії G1.

Збільшення копийности хромосоми 11 виявлено у великій кількості ліній ембріональних стовбурових клітин миші. Це пов'язують з локалізацією в хромосомі гена Stat3 , який бере участь в STAT3 / JAK шляху контролю клітинної проліферації і, відповідно, накопиченням клітин зі збільшеною копийности хромосоми 11 при їх відборі в культуральних умовах на високий рівень проліферативної активності.

Одна з можливих причин відносного дефіциту копій хромосом 6 і 12 обумовлена тим, що в клітинах всіх розглянутих популяцій зустрічалася транслокация між цими хромосомами. Авторами раніше була виявлена така ж транслокация в клітинах мієліт мишей тієї ж лінії BALB / c.

Транслокация t (6; 12) не є типовою для клітин мієлом; як правило, в них зустрічаються варіанти t (6; 15), t (12; 15) - транслокації між хромосомами, що несуть гени імуноглобулінів (хромосоми 6, 12) і онкоген (хромосома 15) (Silva S. et al., 2003) .

Показано, що здатність ЕСК до самопроізводству без диференціювання залежить від експресії комплексу генів, таких, як Esrrb, Tbx3 і Tell, Nanog, 0ct4 і Sox2 . Експресія 0ct4 необхідна для попередження диф- ференціровкі клітин в трофоектодермальном напрямку. Nanog і Sox2 , мабуть, є інтегральними регуляторами, що пригнічують багато диференціювальні програми, а експресія генів Esrrb, Tbx3 і Tc11 необхідна для блокування програм клітинної диференціювання в клітинні лінії, похідні епібласта (Ivanova N. et al., 2006).

Nanog локалізована в сегменті F2 хромосоми 6, Tc11 - в сегменті E хромосоми 12, а Esrrb - в сегменті D2 хромосоми 12. Tbx3 локалізована в сегменті F хромосоми 5, а Sox2 - в сегменті B хромосоми 3 (www.ncbi.nlm.nih. gov).

Таким чином, транслокація t (6; 12) об'єднує три ключових гена з п'яти наявних, які блокують клітинне диференціювання і сприяють самокопірованія клітин щодо збереження плюріпотентності. Цікаво відзначити, що в сегменті C хромосоми 12 локалізована псевдоген Nanog PS2.

Судячи з диференціальної смугастість перебудованої хромосоми, розрив в хромосомі 12 проходить по сегменту E, в якому локалізована ген Tc11. У хромосомі 6 розрив потрапляє на сегмент C, розташований істотно вище локалізації Nanog .

Питання до лекції:

1) Поняття про SCNT.
2) Методи генетичної модифікації клітин.
3) Поняття про трансфекцію.
4) Поняття про трансдукцію.
5) Аденовірусні і лентівірусні вектори, переваги і недоліки.
6) Перешкоди для ефективного репрограмування.
7) Фактори транскрипції.
8) Мікро РНК.
9) Короткі интерферирующие РНК.
10) Епігенетична регуляція експресії генів.
11) Метилирование ДНК.
12) Поняття про трансплантологію.
13) Загальні принципи трансплантології.
14) Поняття про органи мішені.
15) Способи доставки стовбурових клітин.
16) Ксенотрансплантація.
17) Алотрансплантація.
18) Трансплантація штучних органів.
19) Аутотрансплантація.
20) Методи посттрансплантаційного моніторингу регенерації.
21) Трансплантація кісткового мозку.
22) Ерадикація захворювання.
23) Клітинний імунітет.
24) Гуморальний імунітет.
25) Поняття про молекулу головного комплексу гістосумісності HLA.
26) Генотипування по HLA-маркерам

Лекція 4 – Клітинна інженерія.

План лекції

4.1. Трансфекція клітин і генна інженерія.
4.2. Гібридизація соматичних клітин.
4.3. Клонування клітин
4.4. Способи клонування

4.1.1. Технологія отримання партеногенетических ліній ембріональних стовбурових клітин комбінацією з методом перенесення ядра.

4.1.2. Створення гістосумісності ембріональних стовбурових клітин методом партеногенезу.

4.1.3. Гемопоетичне диференціювання і терапевтичний потенціал уніпарентних партеногенетических ембріональних стовбурових клітин

4.1.4. Репрограммування за допомогою ембріональних стовбурових гібридних клітин .

4.1. Трансфекція клітин і генна інженерія

Ключовим етапом в технології створення трансгенних орга низмов є трансфекція - впровадження ДНК в клітини майбутнього трансгенного організму. В даний час розроблено велику кількість методів трансфекції.

Вбудовування активного гена на місце відсутнього або по- вре-жденного відкриває шлях для лікування в результаті генетичних заболевания людини.

Змінювати властивості кліток можна також іншими шляхами:

- введенням клітинних органел, ізольованих з одних клітин, в протопласти інших клітин (активізація фотосинтезу рослинної клітини введенням в неї високоефективних хлоро пластів);

- штучними асоціаціями рослинних клітин з мик- роорганізмамі (моделювання на клітинному рівні природних симбіотичних відносин введенням азотфіксуючих мікро- організмів, що забезпечують рослини азотним харчуванням в природних екосистемах);

- злиттям клітинних фрагментів (без'ядерних, каріопла- стов з ядром, мікрокліток, що містять лише частину генома інтакт- ної клітини) один з одним або з інтактними (непошкодженими) клітинами,

отриманням клітин з різними властивостями, наприклад, гібридів або клітин з ядром і цитоплазмою від різних батьків.

4.2. Гібридизація соматичних клітин

Початок клітинної інженерії відносять до 60-х років двадцятого століття, коли виник метод гібридизації соматичних клітин. Со тичних гібридизацію, тобто отримання гібридів без уча- сті статевого процесу, проводять, культивуючи спільно клітини різних ліній одного виду або клітини різних видів. При певних умовах відбувається злиття двох різних клітин в одну гібридну, що містить обидва генома об'єдналися клітин.

Вдалося отримати гібриди:

- між клітинами тварин, далеких за систематичним положенням, наприклад, миші та курки. Соматичні гібриди знайшли широке застосування як в наукових дослідженнях, так і в біотехнології. За допомогою гібридних клітин, отриманих від клітин людини і миші (1965), людини і китайського хом'ячка, була пророблена важлива для медицини робота з картування генів в хромосомах людини. Гібридизація соматичних клітин живіт- них зіграла важливу роль в дослідженні механізмів реактивації генома спочиває клітини і ступеня фенотипічного прояви (експресивності) окремих генів, клітинного ділення, в карти- ровании генів в хромосомах людини, в аналізі причин злоякісного переродження клітин. За допомогою цього методу створені гібридоми, що використовуються для отримання моноклональних (одно- рідних) антитіл;

- між пухлинними клітинами і нормальними клітинами иммунной системи (лімфоцитами) - так звані гібридоми, обла- дають властивостями обох батьківських клітинних ліній. Подібно раковим клітинам, вони здатні необмежено довго ділитися на штучних поживних середовищах (тобто вони «безсмертні») і, подібно лімфоцитів, можуть виробляти моноклональні (одно- рідні) антитіла певної специфічності. Такі антитіла застосовують в лікувальних і діагностичних цілях, в якості чув- ствительность реагентів на різні органічні речовини:

- між тваринами і рослинними клітинами;

- між соматичними клітинами рослин, звільненими від щільної клітинної оболонки, використовуючи ізольовані прото пласти. У цьому випадку, як і при гібридизації клітин тварин, також вдається долати бар'єри нескрещиваемости, які існують при звичайній (статевий) гі-

бридизації рослин різних видів і родів. З гібридної рослинної клітини на спеціальному середовищі можна виростити клітинну масу - каллюс, диференціювання рующим в нормальне цілу рослину з корінням, стеблами. Та- дещо гібридне рослина можна висадити в землю, вирощувати і розмножувати звичайними способами. Ці методи, на відміну від тра- Діціон, дозволяють порівняно легко і швидко отримувати дотнього кількість генетично різноманітного вихідного мате- ріалу для селекції. Їх застосування призвело, наприклад, до збільшен ня врожайності ряду культур - картоплі, цитрусових.

Перший міжвидовий гібрид при злитті протопластів з клеструм різних видів тютюну був отриманий в 1972 році П. Карлсоном (США). Гібриди, отримані при злитті протопластів, мають важливі відмінності від статевих гібридів, оскільки несуть цитоплазму обох батьків.

Можливе створення гібридів, які успадковують ядерні гени одного з батьків поряд з цитоплазматичними генами обох батьків. Особливий інтерес представляють гібриди рослин, не- сущі цитоплазматические гени стійкості до різних пато- генам і стресових факторів від дикорослих видів або цитоплазматичні гени чоловічої стерильності.

Злиття протопластів використовують також для отримання ги Бріден з цінними в господарському відношенні властивостями між віддаленими видами, які погано або взагалі не схрещуються звичним шляхом. Вдалося, наприклад, «ресинтезувати» рапс, яв- ляющая природним амфідиплоїдом між турнепсом і капу- стій, отримати соматичний гібрид картоплі з томатами. При злитті протопластів створюють і нові клітинні лінії - продумати центи важливих дзвінків.

В основі методу гібридизації соматичних клітин лежить злиття кліток, в результаті чого утворюються гетерокаріони, з- тримають ядра обох батьківських типів. Утворилися Гете рокаріони дають початок двом одноядерним гібридним клітинам. У 1965 англійський вчений Г. Харріс вперше отримав гетерокаріо- ни, утворені клітинами миші і людини. Таку искусствен- ву гібридизацію можна здійснювати між соматичними клітинами, що належать далеким в систематичному отноше- ванні організмам і навіть між рослинними і тваринними клітинами.

Клітинна інженерія широко використовується в селекції росний. Виведено гібриди томата і картоплі, яблуні та вишні. Регенеровані з таких клітин рослини зі зміненою спадкоємця ністю до-

зволяють синтезувати нові форми, сорти, обла дають корисними властивостями і стійкі до несприятливих умов і хвороб. Цей метод і широко використовується для «спа- сення» цінних сортів, уражених вірусними хворобами. З їх паростків в культурі виділяють кілька верхівкових клітин, ще не уражених вірусом, і домагаються регенерації з них здоро- вих рослин, спочатку в пробірці, а потім пересаджують в грунт і розмножують.

4.3. Клонування клітин

Важливу роль в тваринництві зіграла розробка методів тривалого зберігання сперми в замороженому стані і спокуса- ного запліднення. Дослідження по клітинної і генної інженерні Нерії на ссавців розгорнулися тільки з освоєнням техни- ки запліднення in vitro, що забезпечила отримання достатньої кількості зародків на ранніх стадіях розвитку.

Генетичне поліпшення тварин пов'язане з розробкою тех- нології трансплантації ембріонів і методів мікроманіпуляцій з ними:

- отримання одноядцевих близнюків;
- міжвидові пересадки ембріонів і отримання химерних тварин;
- клонування тварин при пересадці ядер ембріональних клітин в енуклеірованние яйцеклітини.

У 1996 шотландським вченим з Единбурга вперше вдалося отримати вівцю з енуклійованої яйцеклітини, в яку було пересаджено ядро соматичної клітини (вимені) дорослої живіт- ного. Ця робота намітила перспективи в області клонування тварин і принципову можливість клонування в буду- щем і людини. У цій же лабораторії було отримано ще п'ять клонованих ягнят, в геном одного з яких був вбудований ген білка людини. Клітинна інженерія дозволяє конструювати клітини нового типу за допомогою мутаційного процесу гібрідіза- ції і, більш того, комбінувати окремі фрагменти різних клітин, клітини різних видів, що відносяться не тільки до різних родів, родин, а й про царства. Це полегшує вирішення багатьох теоретичних проблем і має практичне значення.

Інший напрямок клітинної інженерії - маніпуляції з без'ядерними клітинами, вільними ядрами та іншими фрагмен- тами, що зводяться до комбінування різнорідних частин клітини. Ці експерименти, а також мікроін'єкції в клітку хромосом, барвників проводять для

з'ясування взаємних впливів ядра і цитоплазме, факторів, що регулюють активність генів.

Шляхом з'єднання клітин різних зародків на ранніх стадіях їх розвитку вирощують мозаїчних тварин, або химер, з- стоять з двох розрізняються генотипами видів клітин. З по- міццю таких експериментів вивчають процеси диференціювання клітин і тканин в ході розвитку організму.

Які точаться вже не одне десятиліття досліди з пересадки ядер соматичних клітин в позбавлені ядра (енуклеірованние) яйце- клітини тварин з подальшим вирощуванням зародка в дорослий організм з кінця XX століття отримали широку извест- ність як клонування тварин.

Перевага клітинної інженерії в тому, що вона дозволяє експериментувати з клітинами, а не з цілими організмами. По- останньої набагато складніше, а іноді і неможливо, особливо в слу чаї ссавців тварин і людини або при отриманні від- віддалених гібридів.

Методи клітинної інженерії в медицині, сільському господстве, промисловості часто застосовують в поєднанні з генною ін- женеро

4.4. Способи клонування

Метод клонування виник в результаті спроб довести, що ядра зрілих клітин, які закінчили свій розвиток, містять всю інформацію, необхідну для кодування всіх ознак організму. Спеціалізація кожної клітини обумовлена включенням певних генів або їх виключенням, а не втратою деяких з них. Перший успіх був досягнутий професором Корнельського університету Стюардом. Він довів, що, вирощуючи окремі клітини їстівної частини моркви в середовищі, містить необхідні поживні речовини і гормони, можна індукувати процеси клітинного ділення, що призводять до утворення нових клітин моркви.

Першим, хто довів можливість штучного одержання близнюків, був німецький ембріолог Дріш. Розділивши клітини двуклеточного зародка морського їжака, він отримав два генетично ідентичних організму. Перші успішні досліди з трансплантації ядер соматичних клітин в яйцеклітину здійснили в 1952 році Бриг і Кінг, які проводили досліди з амебами. А в 1979 році англієць Віладсен розробив метод отримання одноиайцевих близнюків з ембріонів вівці та корови. Однак розвитку ембріонів домогтися не вдалося. У 1976 році Дж. Гердон

довів можливість клонування на жабах, а в 1983 році вченим вдалося отримати серійні клони дорослих амфібій.

Змусити клітку розвиватися тільки з материнським диплоїдні набором хромосом теоретично можливо двома способами: терапевтичним і хірургічним. Терапевтичний метод винайдений набагато раніше. Понад сто років тому зоолог Московського університету А.А. Тихомиров відкрив, що яйця тутового шовкопряда під впливом різних хімічних і фізичних впливів можуть розвиватися без запліднення. Такий розвиток було названо партеногенезом. Але воно рано зупинялося - так як партеногенетичного ембріони гинули ще до вилуплення личинок з яєць.

Б.Л. Астауров в 30-і роки XIX століття в результаті тривалих досліджень підібрав термічне вплив, яке одночасно блокувало стадію мейозу, тобто перетворення диплоїдного ядра яйцеклітини в гаплоидное, і активовано незапліднені яйце до розвитку. З ядром, що залишилися диплоїдні, розвиток закінчувалося вилуплення личинок, які повторюють генотип матері, включаючи підлогу.

Клонувати ссавців можна і хірургічним способом, замінивши гаплоидное ядро яйцеклітини на диплоидное, взяте з клітин ембріонів. Ці клітини ще не диференційовані, тобто не почалася закладка органів, тому їх ядра легко замінюють функцію диплоїдного ядра щойно запліднені кліті. Таким методом у США У.Р. Бріггс і Т.Дж. Кінг (1952), в Англії Д.Б. Гордон (1960) отримали генетичні копії жаби.

У 1997 році шотландець І. Уилмут з Рослінгского інституту хірургічним шляхом відтворив знамениту вівцю Доллі - генетичну копію матері. Для цього з клітин її вимені взяли ядро для пересадки в яйцеклітину іншої вівці. Успіху сприяло те, що замість ін'єктування нового ядра застосовувалися дії, що призводять до злиття позбавленої ядра яйцеклітини зі звичайною нестатевий кліткою. Після цього яйцеклітина з заміненим ядром розвивалася як запліднена. Дуже важливо, що цей метод дозволяє взяти ядро клонують особи в зрілому віці, коли вже відомі важливі для людини її господарські ознаки. Але у Доллі були не дуже вдалі попередники. Її творець, Ян Уилмут, справив 277 ядерних трансплантацій: отримав 277 ембріонів, з яких тільки 29 прожили довше шести днів, і один з яких розвинувся в повноцінного ягняти, названого Доллі.

Професор НЕЙФІЛА і його співробітники з Інституту біології розвитку ім. Н.К.Кольцова РАН скопіювали каспійського осетра для порятунку його як виду. У клітці осетра вбивали ядро, на його місце

вводили два сперматозоїда і тепловим ударом змушували їх злитися воєдино для подвоєння набору хромосом в спермії. Далі були задіяні складні внутрішні зв'язки, створювалися сприятливі умови для "виходжування" зародків, які розвивалися в «штучних осетрів ..

Вчені з університету штату Вісконсін Ніл Ферст і Таня Домінко для клонування ссавців використовували яйцеклітину корови, позбавляли її генетичного матеріалу і імплантували молекули ДНК інших клонованих тварин - свині, пацюки, вівці або мавпи. При цьому джерелом спадкового матеріалу служили клітини тканин дорослих особин, взяті, наприклад, з свинячого або щурячого вуха. Після штучного запліднення з коров'ячої яйцеклітини, що отримала нову генетичну інформацію, розвивався зародок іншого ссавця - копія генетичного донора. У лабораторних умовах вдалося благополучно виростити ембріони свині, пацюки, вівці, мавпи і корови. Ці роботи мають важливе значення для розвитку генної інженерії і вивчення можливостей генетичного донорства. Дана методика в майбутньому зможе допомогти збереженню зникаючих і рідкісних видів тварин. Американські дослідники дещо змінили метод клонування, використавши ядра ембріональних (зародкових) фібробластів - клітин, що дають сполучну тканину, взятих з дорослого організму, і, тим самим, різко збільшили ефективність методу, а також полегшили завдання введення «чужого» гена, так як в культурі фібробластів це зробити значно легше.

Зараз перед людством не стоїть питання: "Клонувати чи ні?" Звичайно, клонувати. Завдяки цьому, в сільському господарстві можна отримати високопродуктивних тварин або тварин з людськими генами, а також клоновані органи і тканини для трансплантації людині. Варто інше питання: «Дозволити клонування людини?» З одного боку, це можливість бездітних людей мати своїх власних дітей, отримання клонів для подальшого використання їх в якості донорів необхідних органів. З іншого боку, міркування в дусі апокаліпсису про те, що в майбутньому клони витіснять і знищать

«Нормальних людей», етичні, релігійні та інші проблеми. Питання допустимості клонування людини залишається відкритим.

4.4.1. Технологія отримання партеногенетических ліній ембріональних стовбурових клітин комбінацією методом перенесення ядра

Партеногенез - це процес утворення ембріона з яйцеклітини, які не запліднені сперматозоїдом. У деяких тварин цей процес спостерігається в природі, але жоден вид ссавців не здатний розмножуватися таким чином. Основні причини зупинки розвитку - порушення експресії генів через неправильну картини імпринтингу.

Геномної імпрінтінг - одна з форм регуляції генної експресії, при якій транскрипція гена залежить від статі особини, від якої було отримано аллель цього гена. Дана регуляція здійснюється за допомогою метіліро- вання генів. При импринтинге рівень транскрипції деяких генів визначається підлогою організму, від якого ці гени успадковані. В цьому випадку вклади батьківського і материнського геномів в розвиток організмів неоднакові. Тому для нормального розвитку ембріона необхідний хромосомний матеріал осіб різної статі. В експериментах на мишах партеногенезом вдається отримати зародок з декількох десятків клітин, дуже рідко ці ембріони розвиваються довше (Kono T. et al., 2004).

Але отримання партеногенетического клону не є першочерговим завданням учених. Перспектива використання стовбурових клітин партеногенетических ембріонів (parthenogenetic embryonic stem cells - pESC) в терапевтичних цілях може вирішити етичні проблеми, пов'язані з отриманням ембріональних стовбурових клітин (ESC - ЕСК) і обумовлені створенням і руйнуванням ембріона для їх отримання. Ембріональні стовбурові клітини, отримані з партеногенетических ембріонів, могли б мати велике терапевтичне значення, якби була показана їх здатність до диференціювання, так само, як і ЕСК, отриманих звичайним шляхом. Однак, застосування pESC в медицині поки неможливо, так як у цих клітин порушено розвиток і здатність до диференціювання. Химерні миші, отримані при змішуванні бластомеров нормальних і партеногенетических ембріонів, затримувалися в зростанні, у них спостерігалося часте утворення пухлин (Holm TM et al., 2005).

Дослідникам з Японії на чолі з Takafusa Hikichi вдалося підвищити життєздатність і здатність до диференціювання pESC миші за допомогою технології перенесення ядра (nucleartransfer - NT). Ядро з pESC перенесли в енуклеірованних овоціт, потім з нього виникли нові клітини - NT-pESC. Таким способом сформували 84 клітинні лінії. Деякі лінії отримали внаслідок неодноразового перенесення ядра. Всі ці лінії несли маркери ембріональних стовбурових клітин і мали нормальний каріотип. Здатність до диференціювання цих клітин

виявилася значно вище, ніж у звичайних pESC, що показано серією експериментів in vitro і in vivo (в химерних мишах).

Дослідники використовували дві різні лінії мишей для отримання pESC, щоб уникнути порушень розвитку, пов'язаних з виродженням. Одна з цих ліній - трансгенна - містила маркерний білок GFP. Хромосом- ний матеріал одного овоцитів перенесли в інший, потім штучно запустили розвиток. В результаті отримали партеногенетичного ембріони, а потім і лінії pESC. Далі їх ядра перенесли в овоцити миші іншої лінії і потім индуцировали розвиток. Отримані таким чином ESC мали нормальний каріотип і експресували маркери плюріпотентності - Oct4, Nanog.

Виявлено можливість диференціювання отриманих клітин in vitro в нервову тканину і мезенхіму. В якості контролю використовували дві лінії ESC, що виникли при звичайному запліднені. Потім, NT-pESC використовували для отримання химерних мишей. Органи цих мишей проана- ціалізуватися на вміст клітин NT-pESC і їх дериватів (по маркерні білку). У кожному зразку визначали рівень метилування імпринтованих доменів, які опинилися гіпометілірованнимі в порівнянні з нормою. При цьому клітини NT-pESC хімерізовалі органи і диференціювалися в тканинах мишей.

Таким чином, японська група дослідників показала позитивний вплив процедури перенесення ядра на потенціал розвитку партеногенетических ембріональних стовбурових клітин. Цікаво, що в отриманих лініях NT-pESC не спостерігали феномена втрати Х-хромосоми, що зазвичай буває при партеногенезе. В даному експерименті все каріотіпіческіе і епігенетичні характеристики ліній зберігалися, як і у pESC, протягом декількох пасажів (до 30). Крім того, рівень успішного освіти клітинних ліній після перенесення ядра партогенетіческой клітини в овоціт виявився в 1,5-2 рази вище, ніж при отриманні NT-ESC, коли донором ядра служили соматичні клітини або нормальні ESC. Причини цього зрозумілі.

Можна припустити, що поліпшене розвиток, диференціювання і життєздатність отриманих клітин були наслідком відбору найкращих клітин для донорства ядра і цитоплазми, і цей відбір проводився неодноразово протягом двох і більше переносів генетичного матеріалу в овоціт. Можливо також, що тут спостерігається вплив нової цитоплазми овоциту на ядро. У будь-якому випадку, позитивний ефект перенесення ядра на життєздатність і потенціал розвитку клітин NT-pESC підтверджений серією експериментів. Причини змін потенціалу

розвитку ще належить з'ясувати. Використання партеногенетических клітин в медицині має багатообіцяючі перспективи. Незважаючи на генетичні порушення і аномальність розвитку цих клітин в порівнянні з ESC, дослідження в цій області мають також велике фундаментальне значення.

4.4.2. Створення гістосумісності ембріональних стовбурових клітин методом партеногенезу

Генетично сумісні плюрипотентні ембріональні стовбурові клітини, створені методами перенесення ядра і / або за допомогою партеногенезу (пЕСК), можуть бути потенційним джерелом тканин для трансплантації при різних захворюваннях.

Результатом партеногенезу у багатьох тварин є розвиток нормального ембріона без попереднього запліднення овоциту. Однак гризуни не відносяться до таких видів, так як їх пренатальне розвиток вимагає експресії генів батьківського генома (пронуклеуса). Раніше повідомлялося про отримання пЕСК з партеногенетических бластоцист мишей і приматів (Cibelli JB et al., 2002). При розвитку таких тварин на- спостерігалося явище партеногенетического хімерізма. У людини подібне явище описано при отриманні партеногенетических клітин шкіри і гематопоетичної системи. У 2004 році японською групою Tomohiro Kono вперше показана можливість народження життєздатного потомства з партеногенетически розвинених ембріонів миші (Kono T. et al., 2004).

Експериментальний партеногенез у гризунів є зупинку поділу клітин у другій фазі мейозу з подальшою стимуляцією спеціальними агентами в присутності цітохалазін, який запобігає процес викиду полярного тільця з овоцитів. Таким чином, зберігається диплоїдний, і «псевдозігота» може розвинутися в бластоцисту, з якої і виділяються пЕСК. ПЕСК несуть подвоїти гаплоїдні клітини, тобто вони переважно гомозиготні.

Тканини, отримані з гомозиготних клітин, будуть нести один з двох батьківських наборів генів гістосумісності і, теоретично, вони виявляться краще для пересадки, оскільки ризик їх відторгнення буде значно знижений. Однак у гетерозиготних пацієнтів МНС- гомозиготні тканини можуть атакуватися натуральними кілерами, які розпізнають брак одного з наборів антигенів гістосумісності. Цей процес називається «гібридна стійкість» і часто проявляється при пересадці

кісткового мозку. Тому ідеальним варіантом стала б пересадка генотіпірованних МНС-сумісних клітин.

Американські вчені під керівництвом G. Daley (2006) з Harvard Stem Cell Institute (Harvard University, Boston, USA) розробили метод створення гістосумісності пЕСК. Їм вдалося виділити і охарактеризувати плюрипотентні ембріональні стовбурові клітини, отримані партеногенезом, в яких підтримувалася експресія материнських локусів МНС. Тканини, що виникли з таких клітин, можуть пересідати тваринам донорської лінії без відторгнення.

Після партеногенетичною активації овоцитов мишей і переривання (зупинення) їх розподілу в першій або другій фазі мейозу пЕСК виділяли і генотіпіровалі. Автори застосовували спеціально розроблений метод - пряме секвенування поліморфізмів (SNP-генотипування) для оп- ределенном ліній пЕСК, які несуть послідовності головного комплексу гістосумісності (МНС) донорського овоциту. Тканини, отримані після диференціювання таких клітин, могли б ідеально приживатися після пересадки МНС-сумісним реципієнтам - мишам.

З 74% стимульованих овоцитов, які розвинулися до стадії бластоцисти, дослідники отримали 72 лінії пЕСК. Після проведеного генотипування отриманих ліній виявилося, що 33% (24 лінії) з них гетерозиготних по генам МНС. Відновлення гетерозиготности сталося в процесі рекомбінації. Генотипування фланкують маркерів 17-ї хромосоми (яка несе гени головного комплексу гістосумісності) підтвердило гетерозиготность досліджуваних локусів вже у 8 ліній. Саме ці лінії вчені і назвали рекомбінантними МНС-сумісними пЕСК. Ці лінії культивували на желатині у вигляді ембріоідних тілець в протягом

14 днів, спостерігаючи за наступною експресією МНС. Всі клітини цих ліній експресували МНС і мали переважно нормальний каріотип (Меліхова В.С., 2007б).

Для отримання генетично ідентичних клітин використаний ще один метод: индуцировали партеногенетичний розподіл зрілих овоцитів мишей гібридної лінії C57BL / 64CBA F1, змінюючи процес сегрегації парних гомологічниххромосом під час першої метафази мейозу. При цьому виходили партеногенетичного ембріони, які були клонами донорського овоциту в результаті запобігання сегрегації гомологічних материнських і батьківських хромосом. В цьому випадку автори отримали 23 лінії з 56% активованих овоцитов, а гетерозиготность по генам МНС спостерігалася у 21 лінії.

Плюріпотентность отриманих пЕСК дослідники підтверджували формуванням тератом при пересадці клітин під шкіру імунодефіцитних мишам. Крім того, виявлялися спонтанно скорочуються кардіоміоцітарние колонії в культурі, і стандартне розеткоутворення на полужидкой середовищі, характерне для клітин гемопоетичного ряду. При ін'єкції отриманих пЕСК в бластоцисту розвивалися химерні миші.

Отримані клнткі пересаджували імунокомпетентним тваринам після попередньої диференціювання в культурі, так як недиференційовані ембріональні стовбурові клітини не експресують молекул комплексу МНС (Rideout WM et al., 2002). Всі лінії, гетерозиготні і сумісні з реципієнтами по МНС, ідеально приживалися в організмі реципієнта без видимих ознак відторгнення і освіти тератом. У всіх інших випадках пересадок спостерігалося формування тератом.

Здатність пЕСК приживатися в організмі реципієнта і диференціюватися в клітини трьох зародкових листків не викликає сумнівів, проте вплив втрати гетерозиготності найважливішими районами генома на функції клітини в такому випадку залишається мало вивченим. Тканини, отримані шляхом диференціювання пЕСК і несучі один з двох наборів батьківських генів МНС, здатні приживатися в тканинах гетерозиготних реципієнтів (пЕСК з лінії C57BL / 6 приживаються при пересадці мишам гібридної лінії C57BL / 64CBA F1). На основі цих експериментів можна припустити, що рЕСК, гомозиготні за основними гаплотипу МНС, можуть служити джерелом клітин для пересадок. Деяка різниця буде спостерігатися лише в випадку з клітинами, що несуть повний набір МНС на своїй поверхні, наприклад, клітинами кісткового мозку.

Метод отримання партеногенетических зародків мишей призводить до того, що ембріон несе подвоєний гаплоїдний геном, який раніше описувався як переважно гомозиготний (крім тих районів, які стали гетерозиготних в процесі рекомбінації під час першої фази мейозу). Результати цієї роботи свідчать на користь того, що більшість локусів в пЕСК зазнає рекомбінацію, в результаті чого вони несуть майже повністю гетерозиготний геном. Активація незрілих овоцитов і інгібування першого мейотичного поділу сприяють збереженню значної гетерозиготности в геномі, крім тих районів, які повертаються до гомозиготности за допомогою рекомбінації. Обидва типи клітин (як отримані в першій, так і в другій фазі мейозу) можуть відбиратися для підтримки донорського МНС генотипу.

З використанням методики отримання партеногенетических клонів описално 8 ліній пЕСК з клітин в першій фазі мейозу, які демонстрували повну гетерозиготность у всіх локусах. Однак всі ці клітини виявилися або тетраплоидной, або анеуплоїдних. Отже, незважаючи на те, що вони несли весь материнський геном, їх не можна використо- вувати в якості джерела для трансплантації.

Таким чином, партеногенез, поряд з отриманням ембріональних стовбурових клітин з заплідненого овоциту і ЕСК, створених методом перенесення ядра, може стати одним з перспективних способів отримання персональних ембріональних стовбурових клітин. Основне значення роботи полягає в демонстрації способу аналізу генетичної рекомбінації в процесі партеногенетичною активації, який дозволяє відрізнити патерни рекомбінації, отримані в результаті переривання каріокінез під час першої або другої стадії мейозу.

4.4.3. Гемопоетичних диференціювання і терапевтичний потенціал однородітельскіх партеногенетических ембріональних стовбурових клітин

Ембріональні стовбурові клітини і їх деривати, отримані з партеногенетических ембріонів, розглядаються як один з альтернативних джерел клітин для аутологічної пацієнтспеціфічной клітинної терапії. Партеногенетичного ембріони не здатні нормально розвиватися після имплантационного періоду внаслідок порушення експресії імпринтованих генів, але передімплантаційної розвиток у них, як правило, залишається незмінним. Більш того, в химерних тварин (що складаються з клітин різного походження та генотипу) ці клітини вбудовуються в тканину і функціонують, але порушення експресії імпринтованих генів призводить до дефектів розвитку.

Sigrid Eckardt і колеги з Пенсільванського університету (Eckardt S. et al., 2007), використовували методику так званих однородітельскіх партеногенетических ембріонів і досліджували можливість приживлення стовбурових клітин, виділених з цих ембріонів, в дорослому організмі.

Однородітельскіе партеногенетические лінії ЕСК отримували методом перенесення пронуклеусов: в андрогенетические зиготи переносили чоловічий пронуклеус замість жіночого і, навпаки, в гиногенетические зиготи - жіночий замість чоловічого. З таких зигот ви-

ростили лінії, які використовувалися для ін'єкції клітин в нормальну бластоцисту. Створені таким чином химерні ембріони розвивалися до 14 днів.

Партеногенетические лінії несли маркер (GFP), тому присутність клітин можна було визначити як в химерних ембріонах, так і після трансплантації у дорослих тканинах. Для відновлення гемопоезу фетальні клітини печінки химер (як партеногенетические, так і нормальні) вводили в летально опромінену миша.

Фетальні клітини печінки нормальних ембріонів і партеногенетических химер реконструювали гемопоез з однаковою ефективністю. Внесок партеногенетических і нормальних клітин в відновлення гемопоезу оцінювали через місяць після трансплантації. Рівень хімерізма збільшувався, і через 6-9 місяців після трансплантації в периферичної крові більшість клітин мало партеногенетичний походження. Рівень хімерізма не залежав від того, чи були клітини Андро або гиногенетические.

Кількість нормальних, Андро і гиногенетических GFP- експресують клітин в лімфоїдної, мієлоїдної та еритроїдної популяції визначалося однаковим. Високий рівень трансплантованих клітин виявлявся в селезінці, тимусі і кістковому мозку. Спостерігалися тварини з повністю заміщені клітинами і функціонально активними форменими елементами крові. Серійні трансплантації підтвердили здатність партеногенетических гемопоетичних клітин до самооновлення. Щоб перевірити, чи можуть партеногенетические клітини розвиватися за відсутності нормальних клітин, проведено аналіз їх диференціювання in vitro (Kennedy M. et al., 2003). Обидві партеногенетические лінії давали початок гемопоетичних стовбурових клітин і всіх лініях гемопоетичних диференціювання. Таким чином, автори не виявили відмінностей в приживлюваності і функціонуванні партеногенетических або нормальних ембріональних стовбурових клітин.

Виконано аналіз рівня експресії імпринтованих генів гемопоетичних клітин до трансплантації і після неї. Андрогенетические клітини, ізольовані з печінки химер, мали більш високий рівень експресії генів, експресуються в нормі з батьківських алелей (Dlk-1 , Igf2 , і Peg3) в порівнянні з нормальними або гіногенетіческіх клітинами, і менший рівень - для генів материнських алелів (Igf2r) . Гіногенетіческіе клітини, навпаки, оверекспрессіровалі гени, в нормі транскрибується з материнських алелів. Таким чином, партеногенетические клітини, виділені з печінки химер, мали залежить від батькі-

вського походження характер експресії імпринтованих генів. Аналіз партеногенетических клітин, виділених з дорослих реципієнтів, показав нормальну експресію імпринтованих генів.

Використовуючи RT-PCR, автори оцінили рівень транскрипції імпринтованих генів цих клітин і клітин периферичної крові партеногенетического походження. Крім гена U2af1-rs1 ніяких відмінностей між експресією імпринтованих генів не було виявлено. Аналіз метилування імпринтованих локусів показав, що навіть при порушенні метилування в партеногенетических лініях серед клітин реципієнта, утворених з цих ліній, є клітини з нормальною картиною метилування. Тобто, зміна метилування відбувається вже в організмі при диференціюванні цих клітин.

Таким чином, показана реконструкція гемопоезу у летально опромінених мишей після пересадки однородітельскіх партеногенетических клітин фетальної печінки. Гемопоетичних диференціювання in vitro показує можливість цих клітин самостійно розвиватися в гемопоетичні стовбурові клітини, без впливу нормальних клітин, як це відбувається в хи- мірних мишах. У даній роботі виявлено їх здатність до проліферації і навіть заміщення тканини дорослого органу незалежно від того, чи були клітини Андро або гиногенетические. Отже, ці клітини можна розглядати як потенційний ресурс для трансплантації та регенеративної медицини. Було показано, що ці клітини гістосумісності по відношенню до організму - донору ядра. Для можливого використання партеногенетических ембріональних стовбурових клітин в клітинної терапії необхідні подальші дослідження.

4.4.4. Репрограмування за допомогою ембріональних стовбурових гібридних клітин

Клонування ссавців показало, що ядро коммітірованних (соматичної) клітини може бути репрограммироваться до рівня тотіпотентності, якщо його перенести в цитоплазму енуклеірованних овоциту. Після такого перенесення, як вважають більшість дослідників, донорське ядро набуває потенції за допомогою епігенетичних механізмів без зміни структури ДНК. До 1998 року це була єдина технологія відновлення потенцій в соматичних клітинах. Тим часом, ембріональні стовбурові клітини, отримані з внутрішньої клітинної маси бластоцист, також мають плюрипотентними або навіть поліпотентними властивостями, судячи з їх внеску в різні органи і тканини,

що розвиваються химер і здатності в умовах in vitro диференціюватися в гамети. Запропоновано використовувати потенціал ЕСК для репрограмірованія індивідуальних хромосом або цілого ядра соматичних клітин шляхом злиття ембріональних стовбурових клітин зі спленоцитах дорослих тварин.

Уже перші експерименти на ембріональних стовбурових гібридних клітинах (ЕСГК) показали, що вони зберігають багато характеристик ЕСК, включаючи здатність утворювати in vitro ембріоідние тільця, що містять різні спеціалізовані клітини, і генерувати розвиток химер. Незважаючи на те, що реконструйовані овоцити і ембріональні стовбурові гібридні клітини мають репрограмірующей активністю, організація їх геномів різна. На відміну від реконструйованих ооцитів, ЕСГК містять два генома з різною попередньої «історією розвитку», які, перебуваючи в одному ядрі, легко можуть обмінюватися трансдіючими регуляторними сигналами.

Крім того, виявлено краща сегрегація (втрата) хромосом соматичного партнера в багатьох незалежних клонах ембріональних стовбурових гібридних клітин. Це дозволило оцінити роль цис- і трансрегуляції в підтримці плюрипотентні статусу ембріональних стовбурових гібридних клітин. Несподіваним виявилося, що в клонах ЕСГК з різним числом хромосом соматичного партнера плюріпотентность виявлялася як домінантна ознака, тобто практично вона не залежала від присутності соматичних хромосом. Це передбачає, що плюріпотентность хромосом ЕСК підтримується в ЕСГК цис-способом і цілком резистентна до дії транс-діючих факторів, що виходять від соматичних хромосом. Що стосується репрограмірованія соматичного генома або його окремих хромосом в ембріональних стовбурових гібридних клітин, то є численні дані, що підтверджує цей факт: активація раніше сайленсірованних генів і, навпаки, репресія тканеспецифических генів, активних в соматичному геномі перед злиттям; реактивация неактивній Х-хромосоми.

Згідно з даними CACowan et al. (2005), геном фибробласта репрограммируется на 99% в гібридних клітинах, отриманих злиттям фібробластів людини з мбріональнимі стовбуровими клітинами людини.

Таким чином, ембріональні стовбурові гібридні клітини є новим потужним інструментом для відновлення потенцій і репрограмірованія або цілого генома, або окремих хромосом діффренцірованних клітин.

Питання до лекції

1) Поняття про терапевтичне клонування.
2) Поняття про клітинну та тканинну інженерії.
3) Принципи клітинної та тканинної інженерії.
4) Пристрій і оснащення лабораторії клітинної та тканинної інженерії.
5) Методи терапевтичного клонування.
6) Устаткування для проведення терапевтичного клонування.
7) Юридичний статус технології.
8) Репродуктивне клонування.
9) Клонування в біології.
10) Застосування стовбурових клітин для створення штучних органів.
11) Самоорганізація клітин.

Рекомендована література

Базова література

1. Regenerative Medicine: Laboratory to Clinic, Asok Mukhopadhyay, Springer, 2017, 537 p.
2. Bone and Cartilage Regeneration, Phuc Van Pham, Springer, 2017, 315 p.
3. Nanoengineered Biomaterials for Regenerative Medicine, Masoud Mozafari, Jayakumar Rajadas, David Kaplan, Elsevier, 2018, 516 p.

Допоміжні

4. Bioprinting in Regenerative Medicine, Kursad Turksen, Springer, 2015, 140 p.
5. Regenerative Medicine Technology: On-a-Chip Applications for Disease Modeling, Drug Discovery and Personalized Medicine, Sean V. Murphy, Anthony Atala, CRC Press, 2016, 428 p.
6. Applications of Nanocomposite Materials in Orthopedics, Dr. Inamuddin, Abdullah M. Asiri, Ali Mohammad, Woodhead Publishing, 2018, 328 p.
7. Патология: учебное пособие. Под ред. Т.А. Федориной. Самара.: Изд-во «Офорт», 2016, 336 с.

Розроблено в рамках проекту** «Erasmus+ (CBHE) BioArt: **«Інноваційна мультидисциплінарна навчальна програма зі штучних імплантів для біоінженерії для рівнів бакалавр та магістр»
Developed in the frame of project** «Erasmus+ (CBHE) BioArt: **Innovative Multidisciplinary Curriculum in Artificial Implants for Bio-Engineering BSc/MSc Degrees» (586114-EPP- 1-2017- 1-ES- EPPKA2-CBHE- JP)