

Семченко В.В.
Ерениев С.И.
Степанов С.С.
Дыгай А.М.
Ощепков В.Г.
Лебедев И.Н.

РЕГЕНЕРАТИВНАЯ БИОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

Генные технологии и клонирование

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации
Омский государственный аграрный университет
Институт ветеринарной медицины и биотехнологий
Всероссийский научно-исследовательский институт бруцеллеза и туберкулеза животных
Россельхозакадемии
Российский национальный исследовательский медицинский университет
НИИ медицинской генетики СО РАМН
НИИ фармакологии СО РАМН
Омский научно-исследовательский центр СО РАМН
Омская государственная медицинская академия
Ханты-Мансийская государственная медицинская академия

В.В.Семченко, С.И. Ерениев, С.С. Степанов,
А.М. Дыгай, В.Г.Ощепков, И.Н.Лебедев

РЕГЕНЕРАТИВНАЯ БИОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

Книга I Генные технологии и клонирование

Под общей редакцией академика РАМН В.П.Пузырева,
член–корреспондента РАМН К.Н.Ярыгина и академика РАМН В.Н.Ярыгина
и профессор В.В. Семченко

Коллективная монография

Рекомендовано к изданию проблемными комиссиями «Медицинская генетика», «Фармакология и лекарственные растения» научного совета № 55 по медицинским проблемам Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера РАМН, ученым советом научно-исследовательского института морфологии человека РАМН, ученым советом научно-исследовательского института бруцеллеза и туберкулеза животных Россельхозакадемии, научно–техническим советом Омского государственного аграрного университета

Омск – Москва – Томск
2012

УДК 575.113.1+577.21:616-092.4/9
ББК 52.54
Р 32
О-753

Семченко В.В., Ерениев С.И., Степанов С.С., Дыгай А.М., Ощепков В.Г., Лебедев И.Н. Регенеративная биология и медицина. Книга I. Генные технологии и клонирование / Под ред. В.П.Пузырева, К.Н.Ярыгина и В.Н.Ярыгина. – Омск – Москва - Томск: Омская областная типография, 2012. –296 с.

Это первая из трех книг, представляющих обзор одной из наиболее быстро развивающихся областей биомедицины – регенеративной биологии и медицины. Во всех трех книгах наряду с изложением фундаментальных данных особое внимание уделено практическому использованию накопленных знаний для разработки генных, клеточных, тканевых и органных биотехнологий лечения различных заболеваний, клонирования клеток и животных. Рассматриваются также методы контроля потенциальных опасностей, связанных с практическим использованием генных и клеточных технологий.

Книга рассчитана на биологов, генетиков, цитологов, гистологов, эмбриологов, физиологов, патофизиологов, фармакологов, научных работников, врачей различных специальностей, студентов медицинских и ветеринарных вузов.

Библиография – 397 названий.

Рецензенты: доктор биологических наук, профессор В.А. Аикин; член-корреспондент РАМН, доктор медицинских наук, профессор В.В.Банин; академик РАМН, доктор медицинских наук, профессор С.И.Колесников.

ISBN – 978-5-87367-177-9

© В.В.Семченко, С.И.Ерениев, С.С.Степанов, А.М.Дыгай, В.Г.Ощепков, И.Н.Лебедев, 2011

© Институт ветеринарной медицины и биотехнологий Омского государственного аграрного университета, 2012

Semchenko V.V., Ereniev S.I., Stepanov S.S., Dygai A.M., Oshchepkov V.G., Lebedev I.N. Regenerative biology and medicine. Book I. Gene technologies and cloning / Series General Editors: V.P.Puzyrev, K.N. Yarygin and V.N. Yarygi, V.V. Semchenko. – Omsk-Moscow-Tomsk: Omsk regional printing house, 2012. –296 p.

This is Book 1 of a series of three books presenting a survey of one of the most rapidly expanding fields of biomedicine – regenerative biology and medicine. In all three books of the series special attention is given to the ways of translation of basic knowledge into new biomedical technologies of treating currently incurable diseases or cell and animal cloning. Methods of monitoring the potential hazards related to practical use of gene and cell technologies are also thoroughly considered.

This book and the series as a whole are aimed at biomedical research scientists, medical doctors, and the academic staff of life sciences, medical and veterinary departments of the universities.

The bibliography – 397 titles.

A.M.Dygai - The honoured worker of a science of the Russian Federation, Full Member of the Russian Academy of Medical Science, DrSci in medical sciences, Professor, Head of Institute of Pharmacology of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences/

S.I. Ereniev – DrSci in medical sciences, Professor at Chair of the Medicine of Work-Related and Occupational Diseases at the Omsk State Medical Academy.

I. N. Lebedev – DrSci in biological sciences, Head of Laboratory at the Cytogenetics Institute of Medical Genetics of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences.

V.G. Oshchepkov – The honoured worker of a science of the Russian Federation, DrSci in veterinary sciences, Professor at the All-Russia Scientific Research Institute of Brucellosis and Tuberculosis of Animals.

V.P. Puzyrev – The honoured worker of a science of the Russian Federation, Full Member of the Russian Academy of Medical Science, DrSci in medical sciences, Professor, Head of Institute of Medical Genetics of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences, Head at the Chair of Medical Genetics at the Siberian State Medical University.

V.V. Semchenko – DrSci in medical sciences, Professor of the Chair of Anatomy, Histology, Physiology and Pathological Anatomy at the Institute of Veterinary Medicine and Biotechnologies of the Omsk P.A. Stolypin State Agrarian University.

S.S. Stepanov – DrSci in medical sciences, Chair of of Anatomy, Histology, Physiology and Pathological Anatomy at the Institute of Veterinary Medicine and Biotechnologies of the Omsk P.A. Stolypin State Agrarian University.

V.N. Yarygin – Full Member of the Russian Academy of Medical Science, DrSci in medical sciences, Head of the Chair of Biology at the N.I.Pirogov Russian State Medical University.

K.N. Yarygin – Corresponding Member of the Russian Academy of Medical Science, DrSci in biological sciences, Head of Cell Biology Lab at V.N.Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry.

The editor-in-chief: DrSci in medical sciences, Professor V.V. Semchenko.

Reviewers: DrSci in pedagogical sciences, Professor V.A.Aikin; Corresponding Member of the Russian Academy of Medical Science, DrSci in medical sciences, Professor V.V.Banin; Full Member of the Russian Academy of Medical Science, DrSci in medical sciences, Professor S.I.Kolesnikov.

ISBN 978-5-87367-177-9

© S.I.Ereniev, V.V. Semchenko, S.S.Stepanov, A.M.Dygai, V.G. Oshchepkov, I.N. Lebedev, 2021

© Institute of veterinary medicine and biotechnologies of Omsk state agrarian university, 2012

ПРЕДИСЛОВИЕ

Внедрению в клиническую практику инновационных методов, в том числе технологий регенеративной медицины, предшествует длительный путь экспериментальных исследований. Наряду с изучением биологии и динамики стволовых клеток (клеток-предшественниц) в лабораторных условиях, в частности «in vitro», успешно применяется альтернативный подход, когда эмбриональные, а также региональные или резидентные стволовые и прогениторные клетки (клетки-предшественницы) превращаются в клетки различных органов (заместительный сценарий) или же их появление в организме стимулирует собственные клетки-предшественницы к вступлению в соответствующие гистогенезы (трофический сценарий). Достигнуты значительные успехи в применении стволовых и прогениторных клеток из различных источников на экспериментальных моделях болезни Паркинсона, сосудистых, токсических и травматических поражений нервной системы, сахарного диабета I и II типа, лейкемии и многих других заболеваний. Стволовые клетки из костного мозга успешно используются специалистами США, Европы, Японии и других стран в кардиологии, нефрологии, гепатологии, онкологии и иных разделах гуманитарной и ветеринарной медицины.

Однако, история показывает, что, по крайней мере, в области медицины, у каждого инновационного направления, каким является регенеративная медицина, обязательно находятся скептики, ставящие под сомнение его возможности и, в первую очередь, безопасность применения соответствующих терапевтических технологий. Среди них есть как приверженцы устоявшихся традиционных методов, так и представители фарминдустрии, которые объективно усматривают серьезную угрозу сбыту их продукции в результате внедрения, даже в качестве дополнительных к принятым схемам лечения того или иного патологического состояния новейших высокоэффективных методов биомедицины. Небезинтересно и то, что вполне признается современной медициной: существуют болезни и патологические состояния, в отношении которых практическая гуманитарная и ветеринарная медицина на сегодняшний день фактически не имеет методов и способов их эффективного лечения.

Цель данного издания – доступно изложить основы регенеративной биологии и медицины, генной, клеточной, тканевой и органной инженерии и терапии; на экспериментальном и клиническом материале показать ее потенциальные возможности.

Издание планируется в нескольких, по крайней мере трех, книгах. В первой книге рассматриваются вопросы генной инженерии и терапии, клонирования клеток, тканей, органов и животных. В последующих книгах будут освещены вопросы клеточной инженерии и терапии, тканевой и органной инженерии и терапии, показания и противопоказания к регенеративной биотерапии, возможные осложнения. Исключительно важны такие чисто практические вопросы, как забор, тестирование, хранение и отпуск клеточного и тканевого материала, а также законодательная и нормативная база регенеративной биомедицины, механизмы действия, источники получения и способы применения клеточного и тканевого материала, положения о клинических испытаниях клеточных технологий, этические и другие вопросы. Этого нельзя сделать без определения понятий и терминов, используемых в регенеративной биологии и медицине, которые приводятся в книге.

Информация излагается с учетом различных точек зрения. Представленный материал может быть введен в соответствующие разделы рабочих программ образовательного процесса в медицинских и ветеринарных высших учебных заведениях.

Для желающих подробнее ознакомиться с положениями и приложениями регенеративной биомедицины и, в частности, с клеточной трансплантологией приводится список основных отечественных и зарубежных публикаций последнего десятилетия.

При этом авторы подчеркивают, что они не претендуют на всеохватывающую полноту освещения проблемных вопросов и не противопоставляют регенеративную биомедицину традиционным направлениям ветеринарной и медицинской науки и практики. Они считают, что только адекватное сочетание различных подходов может обеспечить максимальный терапевтический эффект, и с благодарностью примут все критические замечания и пожелания, которые окажутся полезными в дальнейшей работе, чем, собственно, и определяется относительно большое число соавторов и квалификация издания: «коллективная монография».

Академик РАМН В.Н.Ярыгин

ВВЕДЕНИЕ

Биомедицинские технологии, генная, клеточная, тканевая и органная трансплантология как самостоятельное научно-практическое направление биомедицины уже существуют на протяжении многих десятилетий. Интерес к эмбриональным, фетальным и соматическим стволовым клеткам взрослого организма (региональные, резидентные) возрос после появления молекулярных и клеточных технологий, а также методов клонирования, позволяющих целенаправленно генетически модифицировать клетки и организмы. В настоящее время наука предлагает различные биотехнологии для использования в ветеринарии, сельском хозяйстве и гуманитарной медицине. Однако большинство генных, клеточных и других биомедицинских (биоветеринарных) технологий находятся на стадии разработки и/или испытаний (доклинических или клинических). В связи с этим в настоящее время они не могут быть выпущены на рынок и использоваться в клинической практике.

Регенеративная биология и медицина характеризуются лавинообразным накоплением фактического материала, осмыслить и проанализировать который невозможно без четкого определения базовых понятий и основных тенденций современных научных разработок.

В этой связи нами проведен анализ имеющихся в открытой печати публикаций и результатов собственных исследований для максимально полного представления о достижениях и перспективах регенеративной биологии и медицины. В процессе набора материала, последующей его классификации, синтеза и поиска формы представления возникла объективная необходимость написания не менее трех книг по проблематике одного научно-практического направления.

Введение материалов по культуральным, генноинженерным и прочим технологиям представляется вполне оправданным, в частности тем, что это является необходимым и обязательно используется с различными целями при разработке биомедицинских клеточных технологий (клеточные и тканевые культуры), а генноинженерный подход определяет перспективу получать клеточный материал с заданными свойствами.

Следует подчеркнуть, что в относительно молодом направлении науки – регенеративная биология и медицина – обобщающего анализа состояния накопленных знаний, особенно под углом зрения разработки генных и клеточных технологий лечения различных заболеваний в России до настоящего времени не проводилось. Имеющиеся в этом плане обзоры и монографии не отражают всех аспектов регенеративной биологии и медицины, не говоря о регенеративной биологии и ветеринарии. При этом

необходимость подобных работ, на фоне значительного интереса к широкому использованию клеточных технологий в практике, очень высока. Так, проведенные в 2011 году на базе НИИ морфологии человека РАМН научно-практическая конференция «Регенеративная биология и медицина» и на базе Ханты-Мансийской государственной медицинской академии эмбриологический симпозиум-III показали «Югра-Эмбрио-2011».

Первая книга «Генные технологии и клонирование» посвящена теоретическим и практическим аспектам биомедтехнологии и биомедицины. Как уже отмечалось, для удобства в приложении к первой книге дается словарь специальных терминов, имеющих отношение к генным, клеточным, тканевым и органным биомедицинским (биоветеринарным) технологиям.

В первой главе указанной книги представлены основные положения, направления и методы генной инженерии, описаны особенности применения данных способов в лечении различных, в частности, нейродегенеративных заболеваний.

Во второй главе дана характеристика и основные направления применения генной терапии. Проведена подробная оценка результатов использования методов генной терапии для ряда болезней, включая митохондриальные, сердечно-сосудистые и онкологические заболевания, также существа, степени тяжести осложнений и способов профилактики и борьбы с ними.

Третья глава посвящена актуальным вопросам культивирования клеток. Большое внимание уделено культивированию стромальных и гемопоэтических стволовых клеток костного мозга, 3D-культивированию, хромосомным aberrациям, возникающим в стволовых и прогениторных клетках, в частности, человека в процессе их культивирования и другим не менее значимым и, одновременно, непростым вопросам, связанным с выращиванием клеток вне организма.

В четвертой главе представлена развернутая характеристика теоретических и практических вопросов клонирования клеток человека и животных. Дана оценка методам клонирования и результатам применения этих методов для клонирования различных млекопитающих (собаки, олени, лошади, коровы, свиньи, овцы). Оценивается перспективность клонирования приматов с позиций разработки новых технологий получения плюрипотентных стволовых клеток не от эмбрионов, что сопряжено с определенными этическими проблемами.

Большое внимание уделено терапевтическому клонированию. Рассматриваются реальные потребности в терапевтическом клонировании, состояние исследований по терапевтическому клонированию в России и мировые тенденции развития этого направления. Изложены общебиологические, иммунологические (что принципиально важно с учетом мнения ныне действующих практических врачей), технические причины

существующих проблем клонирования и, в некоторой степени, его относительно малой эффективности.

Пятая глава посвящена обсуждению актуальнейшей проблемы безопасности генных и клеточных биомедицинских (биоветеринарных) технологий. Дана оценка основным препятствиям для использования на практике стволовых клеток, необходимости паспортизации в установленном порядке для обеспечения безопасности при работе с клеточным материалом в интересах терапевтической медицины. Большое внимание уделено проблеме риска при использовании клеточного материала. Обсуждены нерешенные вопросы и перспективы обеспечения безопасности генных и клеточных биомедицинских технологий.

Целью первой книги, таким образом, является подготовка читателя к восприятию более объемного и сложного материала второй и третьей книг, которые планируется посвятить клеточным, тканевым и органным биомедицинским технологиям в ветеринарной и гуманитарной медицине.

Трудно загадывать, но во второй книге будут представлены практически все известные на настоящее время направления использования клеточных биомедицинских (биоветеринарных) технологий при различных заболеваниях: неврологических, глазных, стоматологических, сердечно-сосудистых, у человека также психических, при повреждении нервных и эндокринных структур, органов дыхания и желудочно-кишечного тракта, мочеобразования и мочевыделения, а также в репродуктивной медицине.

В третьей книге будут рассмотрены вопросы тканевой и органной инженерии, в основном, под углом зрения создания и применения терапевтических биомедицинских (биоветеринарных) технологий.

Исследования в области регенеративной биологии, биомедицины и биоветеринарии с полным основанием можно отнести к инновационным разработкам. Вместе с тем необходим строгий контроль за внедрением результатов этих исследований в практическую ветеринарию и гуманитарную медицину. Недобросовестное использование непроверенных в требуемом, особенно в части их безопасности, методик специалистами с недостаточной подготовкой и опытом наносит ущерб генной, клеточной, тканевой и органной трансплантологии и, что самое главное, подвергает опасности жизнь пациентов (животных и человека). Всесторонняя оценка современного состояния вопроса клеточных биомедицинских (биоветеринарных) технологий поможет предупредить негативные последствия для науки и, что особенно важно, практики, стимулировать их развитие и внедрение в практическую медицину.

В связи с выше изложенным в первой книге большое внимание уделено правовым и морально-этическим вопросам использования генных и клеточных технологий нового поколения (имеется ввиду постгеномный период развития биологии, в частности, клеточной).

Классическая (домолекулярная), генетика, идущая от признака к наследственному задатку (или гену, или нуклеотидной последовательности

ДНК) в настоящее время переживает кризис. А ведь на этом стоит все здание медико-генетического консультирования как одного из видов специализированной медицинской помощи (как правило, профессиональная деятельность врача-генетика начинается с пробанда). Не секрет также и то, что понятие моногенного независимого наследования признаков (менделизм) в ближайшее время уступит свое место представлениям о роли генных сетей в генетическом (биоинформационном) сопровождении процессов развития в жизнедеятельности. Думается, что не за горами очередь критического осмысления в свете данных новейшей молекулярной биологии, молекулярной генетики, клеточной биологии и принципа сцепленного наследования признаков (см. хромосомную теорию наследственности Т.Г. Моргана-морганизм.) Все это, отражая специфику текущего момента в представлениях о мире жизни, и определило наше решение издать «коллективную монографию».

БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОИНЖЕНЕРИЯ

Биотехнология (греч. bios – жизнь, technos – умение, мастерство, logos – учение) как самостоятельное направление в науке и производстве возникла в последние 20-30 лет на стыке микробиологии, молекулярной биологии, геномной и белковой инженерии, химической технологии, иммунологии, цитологии и ряда других наук. Появление биотехнологии обусловлено необходимостью получения новых веществ, которые невозможно получить другими известными методами (например, химическим синтезом), а также поиском более технологичных и экономичных способов получения продуктов, воспроизведения таких биологических процессов, которые не наблюдаются в природе (Пальцев М.А., 2004).

С развитием биотехнологий связывают ликвидацию нехватки продовольствия, энергии, минеральных ресурсов, увеличение возможностей здравоохранения и улучшение состояния окружающей среды. Биотехнологии сводятся к получению сложных продуктов и веществ из биологических объектов. В качестве последних в биотехнологии используют:

- организм животного, в том числе человека (получение крови и ее препаратов из крови доноров, иммунизация животных с целью получения иммунных сывороток);

- органы и ткани животных и человека (например, поджелудочная железа свиней и крупного рогатого скота для получения инсулина, костный мозг человека при лейкозах);

- культуры клеток животных и человека для заражения вирусами и последующего приготовления вакцин и диагностикумов;

- культуры бактерий и грибов и продукты, которые они синтезируют, для получения иммунобиологических препаратов, вакцин, диагностикумов, антибиотиков, ферментов, кормовых белков и средств защиты растений.

Выбор этих объектов в биотехнологии обусловлен различными причинами (Глик Б., Пастернак Дж., 2002; Шахов В.П. и др., 2004).

Во-первых, клетки животных, растений и микробные клетки являются своего рода «биофабриками», вырабатывающими в процессе жизнедеятельности разнообразные продукты: белки, жиры, углеводы, нуклеиновые кислоты, витамины, аминокислоты, антибиотики, гормоны, антитела, антигены, ферменты и спирты. Многие из этих продуктов в промышленных масштабах невозможно произвести небиотехнологическими способами из-за сложности процессов их получения и неэкономичности.

Во-вторых, клетки бактерий, животные и растительные клетки чрезвычайно быстро размножаются, что позволяет за несколько суток вырастить на сравнительно дешевых питательных средах в промышленных масштабах десятки и сотни тонн биомассы микробных, животных и растительных клеток.

В-третьих, биосинтез белков, антибиотиков, ферментов значительно экономичнее и доступнее в промышленных масштабах, чем химический синтез.

В-четвертых, биотехнологический процесс в крупномасштабном производстве реализовать проще, чем, например, химический процесс. Для этого разработана вся необходимая технологическая аппаратура: ферментеры для выращивания клеток, мощные саморазгружающиеся сепараторы, сушильные установки, аппаратура для концентрирования, очистки и фасовки продукта.

Биотехнология на основании использования биологических процессов, протекающих в живых системах, или самих живых систем (микробы, животные и растительные клетки), разрабатывает способы получения в промышленных масштабах по новым технологиям тех материалов и веществ, которые нужны человеку для его жизнеобеспечения, либо создает биологические системы, ранее не известные человеку (например, искусственные органы и ткани, трансгенные животные и растения, новые разновидности бактерий и вирусов, современные приборы, биосенсоры) (Глик Б., Пастернак Дж., 2002; Шахов В.П. и др., 2004).

В биотехнологии выделяют несколько направлений:

– ветеринарное, решающее задачу по созданию биотехнологической продукции для животноводства (лекарственные и профилактические препараты), выведению продуктивных видов животных (кормовые и пищевые добавки);

– медицинское, включающее фармацевтическую биотехнологию и технологию производства иммунобиологических препаратов;

– сельскохозяйственное, направленное на создание препаратов, предупреждающих болезни растений (биологические средства защиты растений, трансгенные растения, отличающиеся повышенной продуктивностью и устойчивостью к болезням);

– экологическое, нацеленное на создание способов уничтожения промышленных отходов с помощью биodeградации их микроорганизмами (например, препараты из бактерий, утилизирующих нефть, фенол, метан).

Промышленное производство в биотехнологиях основано на таких принципах, как брожение (ферментация), биоконверсия (то есть превращение одного вещества в другое), культивирование растительных и животных клеток, бактерий и вирусов, генетические и генноинженерные манипуляции (Глик Б., Пастернак Дж., 2002; Шахов В.П. и др., 2004).

С помощью биотехнологий на сегодняшний день уже осуществляется синтез многих продуктов и решается ряд проблем (Глик Б., Пастернак Дж., 2002; Шахов В.П. и др., 2004).

Для ветеринарии и сельского хозяйства биотехнологически производится кормовой белок, кормовые антибиотики, витамины, гормоны, вакцины, биологические средства защиты растений, инсектициды. С помощью методов генной и клеточной инженерии создаются

высокопродуктивные и устойчивые сорта сельскохозяйственных растений, оздоравливаются от накопленных инфекций вегетативно размножающиеся растения. Изучаются возможности введения генов азотфиксации в геном полезных растений, управления процессом фотосинтеза и улучшения аминокислотного состава растительных белков. Разрабатываются бактериальные удобрения, регуляторы роста растений, микробиологические средства защиты растений от болезней и вредителей. Для повышения продуктивности животноводства используется полученный микробиологическим синтезом кормовой белок. В диагностике, терапии и профилактике основных болезней сельскохозяйственных животных используются генноинженерные вакцины, сыворотки и моноклональные антитела. В племенном деле применяется генноинженерный гормон роста, трансплантация и микроманипуляции на эмбрионах домашних животных. Биотехнологии облегчают селекцию растений и животных и разработку новых технологий, повышающих эффективность сельского хозяйства (Шахов В.П. и др., 2004).

Для медицины биотехнологическая промышленность производит биосенсоры для неинвазивного способа определения глюкозы в крови у людей, определения антигенов, антител, искусственную кожу человека (для замены при ожогах), диагностические, профилактические и лечебные препараты против новых и вновь появляющихся инфекций (атипичная пневмония, вирус куриного гриппа, оспа обезьян) с целью биобезопасности, вакцины, антитела, иммуномодуляторы, антибиотики, гормоны, ферменты, витамины, биогенные стимуляторы, адаптогены, аминокислоты, компоненты крови, диагностические препараты, алкалоиды, нуклеиновые кислоты, липиды, антимераболиты, антиоксиданты, противоопухолевые, противоглистные препараты, пробиотики и регуляторные пептиды (Глик Б., Пастернак Дж., 2002; Шахов В.П. и др., 2004).

Для пищевой промышленности биотехнологии дают аминокислоты, органические и неорганические кислоты, пищевые белки, ферменты, липиды, сахара, спирты, дрожжи, заменители сахаров, сиропы, соки, винно-водочную продукцию. В различных производствах используются иммобилизованные ферменты, моноклональные антитела, бесклеточный синтез белка в биореакторах с необходимым набором очищенных клеточных компонентов.

Для химической и энергетической промышленности с помощью биотехнологий получают ацетон, этилен, бутанол, биогаз, этанол, биоудобрения, производится очистка и использование сточных вод.

Для экологических нужд осуществляется биотехнологическая очистка и использование сточных вод, переработка сельскохозяйственных, промышленных и бытовых отходов и побочных продуктов, их деградация с помощью микроорганизмов.

Биотехнология в ближайшие десятилетия будет определять научно-технический прогресс, поэтому в нее вкладываются огромные средства. С 1980 по 2000 год мировой объем продаж биотехнологической продукции

вырос примерно в 8 раз – с 30 до 234 млрд. долларов США. Россия на мировом рынке выпускает биотехнологической продукции только на 1% от этой суммы. При этом в структуре биотехнологического рынка продукция медицинской биотехнологии составляла 17%, иммунобиотехнологии – 9,5%, промышленной биотехнологии – 53%, прочая продукция – 19%.

Вместе с тем, есть опасения, что неконтролируемое производство и накопление генноинженерных живых организмов и продуктов может вызвать биологический дисбаланс в природе и угрожать здоровью человека.

Такие актуальные в XXI веке разделы биотехнологии как геновая, клеточная инженерия и клонирование должны подробно рассматриваться в образовательных программах ветеринарных, сельскохозяйственных и медицинских вузов.

Глава 1. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Генная инженерия является сердцевиной современной биотехнологии. На основе фундаментальных исследований строения и функционирования генома человека, животных, растений, бактерий и вирусов она открывает широкие возможности для получения новых генетических структур и организмов, для разработки способов генодиагностики, генопрофилактики и генотерапии болезней (Глик Б., Пастернак Дж., 2002; Шахов В.П. и др., 2004).

Генная инженерия – это раздел молекулярной биологии и генетики, связанный с целенаправленным созданием новых комбинаций генетического материала, получением с помощью лабораторных приемов организмов с новыми, в том числе и не встречающимися в природе, комбинациями наследственных свойств. Для переноса генетического материала в качестве векторов используются бактериофаги.

В основе генной инженерии лежит возможность целенаправленного манипулирования с фрагментами нуклеиновых кислот. Это стало реальным после установления универсальности генетического кода, то есть факта, что у всех живых организмов включение одних и тех же аминокислот в белковую молекулу кодируется одними и теми же последовательностями нуклеотидов в цепи ДНК, а также после предоставления генетической энзимологией в распоряжение исследователя набора ферментов, позволяющих получить в изолированном виде отдельные гены или фрагменты нуклеиновой кислоты, осуществлять *in vitro* синтез фрагментов нуклеиновых кислот, объединить в единое целое полученные фрагменты.

Изменение наследственных свойств организма с помощью генной инженерии сводится к конструированию из различных фрагментов нового генетического материала, введению этого материала в реципиентный организм, созданию условий для его функционирования и стабильного наследования. Созданный генетический материал способен размножаться в клетке-хозяине и синтезировать конечные продукты обмена.

В результате интенсивного развития методов генной инженерии получены клоны множества генов рибосомальной, транспортной РНК, гистонов, глобина мыши, кролика и человека, коллагена, овальбумина, интерферона и инсулина человека, других пептидных гормонов. Это позволило создавать штаммы бактерий, производящих многие биологически активные вещества, используемые в медицине, сельском хозяйстве и микробиологической промышленности. Для лечебного применения допущен инсулин человека (хумулин), полученный посредством рекДНК. Кроме того, на основе многочисленных мутантов по отдельным генам созданы высокоэффективные тест-системы для определения генетической активности факторов среды, в том числе для выявления канцерогенных соединений.

Генная инженерия может дать в неограниченном количестве гормоны и другие белки человека, необходимые для лечения наследственных болезней.

Усилия генной инженерии направлены на получение бактерий с высокоактивной нитрогеназой, способных в больших количествах связывать и накапливать азот, на разработку методов включения гена нитрогеназы в растительную клетку. Благодаря генной инженерии и слиянию клеток стало возможным производить биотехнологическим методом в промышленных масштабах соединения, синтезируемые живыми организмами в ничтожных количествах.

С помощью генной инженерии получены сотни и тысячи рекомбинантных штаммов бактерий и вирусов, способных синтезировать несвойственные им биологически активные вещества в соответствии с «пересаженным» в их геном «чужеродным» геном, кодирующим образование этого вещества. Таким образом уже получены штаммы рекомбинантных бактерий и вирусов (кишечная палочка, псевдомонады, дрожжи, вирусы), способных синтезировать гормоны человека (инсулин, гормон роста), антигены вирусов гепатита В, вируса иммунодефицита человека, возбудителей малярии, коклюша, бешенства, кори, сифилиса, ферменты (липазы, протеазы), иммуномодуляторы (интерфероны, интерлейкины, пептиды тимуса, костного мозга, фактор некроза опухоли), белки крови (альбумин, комплемент, антикоагулянты, тромболитики), рецепторы клеток, регуляторные пептиды, управляющие нервной, иммунной и другими системами.

Принцип получения в промышленных условиях биологически активных белков генноинженерным способом сводится к созданию рекомбинантного штамма бактерий, способного синтезировать целевой продукт (например, гормон, антиген); выращиванию в производственных условиях рекомбинантного штамма; выделению из биомассы рекомбинантного штамма синтезированного целевого продукта, его очистке, концентрированию и приданию ему лекарственной формы.

Метод генной инженерии в некоторых случаях является единственно возможным, экономичным и реально осуществимым. Так, например, вирус гепатита В, вызывающий одно из самых распространенных и опасных заболеваний, не культивируется в искусственных условиях, следовательно, получить из него вакцинный или диагностический препарат традиционным способом невозможно. Однако выращивание рекомбинантного штамма дрожжей, содержащих ген HBs-антигена вируса В, позволило получить вакцину, которая используется в практике уже более 10 лет. В настоящее время решается задача получения генноинженерных вакцин против гепатита С и ВИЧ-инфекции.

К настоящему времени расшифрован геном многих бактерий и вирусов, а также геном человека. Последнее открыло путь к разработке методов генокоррекции врожденных и приобретенных болезней, генотерапии,

генопрофилактики, повышению резистентности организма к болезням (Пузырев В.П., Степанов В.А., 1997).

Проведены эксперименты по проверке возможности управления функционированием чужеродных генов, введенных в стволовые клетки млекопитающих, с помощью промотора гена белка теплового шока дрозофилы. Такая возможность показана на примере активации гена синего белка (Павлова Г.В. и др., 2004).

1.1. Генетическая модификация клеток для регенеративной медицины

Лечение заболеваний, патогенез которых обусловлен мутациями конкретных генов, требует вмешательства в организм больного на генном уровне. Перспективными методами лечения таких больных являются:

- коррекция экспрессии гена, ответственного за развитие заболевания;
- трансплантация стволовых клеток;
- сочетание генной инженерии с клеточной терапией в виде трансплантации генетически модифицированных стволовых и иных клеток.

Существуют различные виды вмешательств на генном уровне, изложенные ниже (Исламов Р.Р. и др., 2007).

1.2. Посттранскрипционная блокада синтеза белка с помощью РНК-интерференции

Комплементарное взаимодействие короткой интерферирующей РНК (siRNA) с мРНК-мишенью заканчивается деградацией мРНК и прекращением синтеза белка. Способность siRNA инициировать посттранскрипционное «молчание» генов, ассоциированных с конкретными заболеваниями, в культуре клеток и на моделях болезней человека у животных определила новое направление в генной терапии. Совершенствование способов доставки молекулы siRNA в клетку и потенциальная возможность лабораторного синтеза siRNA, комплементарной любой известной мРНК, открывает широкие перспективы применения РНК-интерференции в лечении инфекционных, онкологических и нейродегенеративных заболеваний (боковой амиотрофический склероз, хорея Гентингтона, болезнь Альцгеймера).

1.3. Вирусная трансфекция

Одним из перспективных методов доставки генетического материала в органы и клетки-мишени являются вирусные векторы. С помощью методов генной инженерии в геном вирусов встраивают экспрессионные конструкции, несущие один или более рекомбинантных генов. Подобные конструкции состоят из промотора, рекомбинантного гена и сигнала для полиаденилирования мРНК. В настоящее время используются экспрессионные векторы, основанные на различных вирусах.

1.3.1. Аденовирусные векторы

Это безоболочечные вирионы, несущие двухцепочечный вирусный геном (St George J.A., 2003). Аденовирусные векторы способны инфицировать широкий спектр как делящихся, так и неделящихся клеток. Вирусный геном может принять трансгенные вставки до 8 тысяч пар нуклеотидов. Существенным недостатком данной системы являются нежелательные взаимодействия с иммунной и гуморальной системами организма и, как следствие, развивающиеся осложнения при первоначальном инфицировании и невозможность (при необходимости) повторного использования данной вирусной системы (Schagen F.H. et al., 2004). Из-за отсутствия способности к интеграции в геном хозяина аденовирусная система позволяет добиться лишь временной экспрессии трансгенов.

Исследования стволовых клеток направлены на поиск действенных технологий перепрограммирования соматических клеток в плюрипотентные, способных к различной специализации. В последние годы были определены гены, которые работают в стволовых клетках и определяют экспрессию генома на самых ранних стадиях развития эмбриона. Это гены транскрипционных факторов OCT4, SOX2, KLF4, C-MYC и NANOG и некоторые другие. Если ввести их в соматическую клетку, например в фибробласт, то клетка перерождается и приобретает свойства плюрипотентности. Встает вопрос о том, каким образом можно доставить эти гены в клетку, и не просто доставить, а еще и заставить их там функционировать.

В настоящее время используется вирусная и липосомная передача генов. Липосомы с заключенными внутри генами «плюрипотентности» внедряются в клетку, но эффективность встраивания и активации трансгенного материала чрезвычайно низка. Более эффективно использование вирусного носителя или вирусного вектора. Аденовирусы не способны встраиваться в геном клетки-хозяина, поэтому экспрессия внедренных генов только временная. Последнее свойство со всей очевидностью ограничивает использование аденовирусных векторов для терапевтических целей, так как достигается только временный лечебный эффект, но для ограниченного во времени процесса преобразования соматической клетки в стволовую этот метод подходит как нельзя лучше. Здесь важно запустить процесс индукции.

Отмечается очень низкая эффективность аденовирусного перепрограммирования клеток: при ретровирусном переносе - 0,01-0,1%, а при аденовирусном - 0,0001-0,001%. Однако у этого метода есть несколько преимуществ: ни в одном случае не появилось опухолевых образований (при ретровирусном переносе клетки очень часто порождают опухоли); геном получившейся плюрипотентной клетки не имеет вирусных вставок и потому идентичен геному эмбриональной клетки, что позволяет сравнивать работу обоих геномов. Оба преимущества предполагают широкие возможности для будущих терапевтических разработок (Stadtfield M. et al., 2008; <http://www.celltranspl.ru/news/newspost32>).

1.3.2. Аденоассоциированный вирусный вектор

Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (recombinant adeno-associated virus, rAAV) является одним из перспективных вирусных векторов для генной терапии нейродегенеративных заболеваний (Mandel R.J. et al., 2006). Это непатогенный парвовирус человека, нуждается в коинфекции хелперным вирусом для репликации (Muzyczka N. et al., 2001). rAAV эффективен в нервной системе и инфицирует преимущественно нейроны (Burger C. et al., 2005; McCown T.J., 2005). Несмотря на то, что AAV дикого типа интегрируется в хромосому хозяина, рекомбинантный rAAV потерял данную способность и присутствует в клетке хозяина в виде эписомы. Одним из недостатков rAAV является ограничение на размер вставки трансгенной конструкции (менее 5 тысяч пар нуклеотидов). Использование rAAV позволяет достичь долговременной экспрессии трансгенов (в мозге крыс – до 19 месяцев). Аденовирусные векторы являются одним из самых широко применяемых методов генетической модификации эукариотических клеток и обладают малой токсичностью.

Использование генетически модифицированных клеток как наиболее перспективное направление в клеточной трансплантологии представляет собой сочетание генной и клеточной терапии. Стромальные клетки жировой ткани (СКЖТ), благодаря возможности выделения их в большом количестве у пациентов при минимальном хирургическом вмешательстве, а также высокому уровню экспрессии ими различных митогенных, антиапоптотических и ангиогенных факторов, становятся важным инструментом клеточной терапии.

Изучена возможность генетического модифицирования стволовых клеток жировой ткани человека с помощью плазмидных конструкций и рекомбинантного аденоассоциированного вируса CpAABVJ. Клетки на ранних пассажах трансфицируют плазмидой pсDNA3GFP, используя различные протоколы, а также трансдуцируют rAAV, несущий ген зеленого флуоресцентного белка (GFP), либо VEGF. Эффективность трансдукции клеток определяют микроскопическим анализом и методом проточной цитофлуориметрии. Уровень экспрессии трансгена анализируют с помощью иммуоферментного анализа и иммуоблоттинга. С помощью проточной цитофлуориметрии определяют наличие в популяции СКЖТ клеток, которые несут на своей поверхности гепарансульфат протеогликан, рецептор, через который происходит связывание вируса с клеткой.

Показано, что 55-85% популяции стволовых клеток жировой ткани экспрессируют данный белок. Эффективность трансдукции СКЖТ рекомбинантным вирусом, выраженная в процентном содержании флуоресцирующих, GFP-позитивных, клеток, составляет $60 \pm 7\%$. Флуоресценция GFP наблюдается в течение месяца. Клетки, трансдуцированные вирусом с VEGF, секретируют в 20-30 раз больше белка по сравнению с немодифицированными клетками. Показана возможность

использования рекомбинантного аденоассоциированного вируса человека для эффективной доставки терапевтического гена в стромальные клетки жировой ткани человека (Шевченко Е.К. и др., 2010).

1.3.3. Вирусные векторы на основе герпесвирусов

Вирусные векторы на основе герпесвирусов (*herpes simplex viruses*, HSV) обладают высокой инфекционностью по отношению к нервным клеткам в связи с природным тропизмом данных вирусов. Эти вирусы также участвуют в эффективном anterо- и ретроградном транспорте в нервной системе. Модифицированные герпесвирусные векторы устанавливают эписомную репликацию в клетке хозяина и способны нести значительные трансгенные вставки (< 50 тысяч пар нуклеотидов) (Glorioso J.C. ET AL., 2004). Основными недостатками данной вирусной системы являются иммунный ответ организма на вирусные белки и кратковременная экспрессия трансгенов. Использование вирусных векторов на основе герпесвирусов подробно изучено в отношении рака и нейродегенеративных заболеваний (Latchman D.S., 2005).

1.3.4. Ретровирусы

Ретровирусы также рассматривают как векторы для генетической терапии нейродегенеративных заболеваний. Создаются рекомбинантные вирусные системы, лишённые значительной части генетической информации вируса, что увеличивает их безопасность при клиническом применении. Успешно ведутся работы по псевдотипированию ретровирусов, когда гликопротеины вирусной оболочки ретровирусов заменяют на гликопротеины других вирусов (например, VSV-G, vesicular stomatitis virus), что придаёт рекомбинантным ретровирусам способность инфицировать широкий спектр клеток. Ретровирусы способны нести до 10 тысяч пар нуклеотидов трансгенной информации и вызывают долговременную экспрессию трансгенов. Применение ретровирусов для генной терапии нейродегенеративных заболеваний рассматривается с целью доставки разных факторов роста и нейротрофических факторов в ЦНС (Ralph G.S. et al., 2006).

При нейродегенерации снижается экспрессия нейротрофических факторов, поэтому считается перспективной доставка нейротрофинов с помощью вирусных векторов (например, при болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, болезни Хантингтона и боковом амиотрофическом склерозе). В эксперименте инфицирование трансгенных G93A мышей вирусным вектором, экспрессирующим VEGF (Azzouz M. et al., 2004), или IGF-1 (Kaspar V.K. et al., 2003) существенно отодвигало начало заболевания и значительно увеличивало время жизни G93A мышей. Однако, начатые клинические испытания не выявили положительного эффекта (Zuccato C. et al., 200; Dawbarn D. et al., 2003).

Обезвреженные РНК-вирусы (ретровирусы), содержащие требуемые гены вместе с генами ревертазы и некоторыми другими, направляются к

клетке. После того как клетка с помощью рецепторов опознает вирусную оболочку, вирус внедряет в клетку РНК. В клетке РНК с помощью ревертазы (обратной транскриптазы) переписывается в ДНК и проникает в ядро соматической клетки. Там синтезированная чужеродная ДНК, несущая нужные гены и некоторые вирусные гены, встраивается в ДНК самой клетки. После этого всё идет своим чередом: клетка при делении синтезирует копии обновленного генома, мРНК, необходимые терапевтические белки, ради которых и затевается эта сложная процедура. РНК вируса одеваются вирусной оболочкой и выходят из клетки, заражая новые поколения клеток.

Если встраивание чужеродной ДНК произошло в безопасном месте, то соматическая клетка «молодеет», перерождается в стволовую, точнее, происходит процесс индукции плюрипотентных клеток. Когда гены внесенных транскрипционных факторов встраиваются неудачно, соматическая клетка превращается в опухолевую. Кроме того, эта технология в принципе подходит только для активно делящихся клеток. Для внедрения генного материала в неделящуюся клетку применяют аденовирусный вектор (Глик Б., Пастернак Дж., 2002; Шахов В.П. и др., 2004).

1.3.5. Рекомбинантные ретровирусы

Рекомбинантные ретровирусы – это ретровирусы, гликопротеины вирусной оболочки которых заменяют на гликопротеины других вирусов (например, VSV-G, vesicular stomatitis virus), что придаёт рекомбинантным ретровирусам способность инфицировать широкий спектр клеток.

Получен рекомбинантный аденовирусный вектор для экспрессии транскрипционного фактора НОХВ4 в CD34-клетках, выделенных из пуповинной крови человека (Brun A.C. et al., 2003). Основываясь на ранее опубликованных данных о том, что экспрессия транскрипционного фактора НОХВ4 в стволовых кроветворных клетках мыши приводила к росту пролиферативной активности, выдвинута гипотеза, что экспрессия НОХВ4 в инфицированных CD34⁽⁺⁾-клетках пуповинной крови человека также усилит их пролиферацию. Был достигнут высокий уровень экспрессии трансгенов в клетках-мишенях, но вместо ожидаемого роста скорости пролиферации, инфицированные CD34⁽⁺⁾-клетки преимущественно дифференцировались в миелоидном направлении.

1.3.6. Рекомбинантные лентивирусы

Ленти- и ретровирусные системы способны к эффективной генетической модификации стволовых кроветворных клеток и стволовых клеток пуповинной крови. С помощью рекомбинантного лентивируса, экспрессирующего репортерный белок EGFP, получены модифицированные клетки пуповинной крови человека с фенотипом CD34⁽⁺⁾ и CD38⁽⁻⁾. Средняя эффективность экспрессии трансгена EGFP составила 59±7%. Большинство эритроидных и миелоидных колоний, полученных из инфицированных CD34⁽⁺⁾- и CD38⁽⁻⁾-клеток, экспрессировали ген EGFP. Один из главных

недостатков ретровирусов связан с их способностью к интеграции в геном хозяина в случайных сайтах, что может привести к мутагенезу и активации онкогенов (Szyda A. et al., 2006).

Проведен сравнительный анализ лентивекторов на основе ВИЧ-1 и аденоассоциированных вирусов 2-го серотипа в отношении эффективности трансдукции и стабильности экспрессии трансгена в мезенхимальные стволовые клетки костного мозга человека (Шахбазов А.В. и др., 2008).

1.4. Невирусные системы трансфекции

Процедуры вирусной трансфекции клеток как *in vitro*, так и *in vivo* стали рутинными. Однако остаются нерешенными вопросы эффективной доставки генных конструкций в клетки, не изучены подробно реакции клетки на внедрение генетических конструкций, нет общепризнанных выводов о безопасности и эффективности таких конструкций. Применение вирусов для доставки генетического материала в геном клетки-мишени ограничено возможными иммунологическими и онкогенными побочными эффектами.

Невирусные системы, несмотря на относительно более низкую эффективность трансфекции, обладают высокой биобезопасностью трансгеноза, что существенно облегчает внедрение разрабатываемых генно – клеточных технологий в клиническую практику (Лавров А.В., 2007).

1.4.1. Липидная трансфекция плазмиды

Стволовые клетки, экспрессирующие клонированный ген, могут значительно усилить терапевтический эффект трансплантированных клеток и регенераторный потенциал органа-мишени. Трансфекция эмбриональных стволовых клеток мыши плазмидами, экспрессирующими клонированный ген нейрональной молекулы адгезии L1, обеспечивает не только встраивание этой молекулы адгезии в клеточную мембрану стволовых клеток, но и секрецию её растворимой формы. После трансплантации подобных клеток в травмированный спинной мозг они формировали отростки и обнаруживались в ткани реципиента спустя месяц после трансплантации, тогда как аналогичные, но нетрансфецированные клетки выживали лишь в течение 7 суток. В настоящее время проводятся интенсивные исследования с целью получения генетически модифицированных стволовых мезенхимных клеток, способных дифференцироваться в заданном направлении.

Липидная трансфекция плазмиды ps415VEGF в МСК обеспечивает высокую эффективность доставки конструкции, стимулирует пролиферацию и не влияет на морфологические характеристики культуры (Лавров А.В., 2007).

Применение плазмидных экспрессионных векторов – один из наиболее биологически безопасных подходов для генетической модификации клеток. Основной недостаток плазмид – низкая эффективность трансфекции и высокая стоимость химических трансфекционных препаратов. Кроме того, трансфекционные препараты зачастую обладают выраженной

цитотоксичностью. Отдельную проблему представляет низкая эффективность трансфекции мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК). Полиэтиленимины (polyethyleneimine, PEI) – нано-размерные положительно заряженные (катионные) частицы, состоящие из синтетического полимера – продукта полимеризации этиленимина. PEI способны конденсировать нуклеиновые кислоты и эффективно проникать внутрь клетки.

Для трансфекции клеток чаще всего применяют низкомолекулярные PEI (например, 25 000 кДа). Однако низкомолекулярные PEI обладают относительно высокой цитотоксичностью по сравнению с высокомолекулярными PEI. Кроме того, на сегодняшний день недостаточно исследован вопрос применения высокомолекулярных PEI для трансфекции стволовых клеток человека, в частности ММСК. Предстоит оценить эффективность трансфекции клеток HEK293 и ММСК плазмидами, экспрессирующими репортерные белки LacZ (β -галактозидаза) и GFP (зелёный флуоресцентный белок), с помощью высокомолекулярного PEI (Кудряшова Н.В. и др., 2010).

Проведено сравнение двух методов трансфекции (липофекции и электропорации) плазмидой с геном VEGF121 на четырех культурах мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани. Оценена эффективность трансфекции через 1 сутки на динамику элиминации плазмид через 3, 6, 9 суток и экспрессию целевого гена. Из четырех структур в одной трансфекция не состоялась при применении обоих методов. Эффективность трансфекции разными методами в среднем не различалась. Анализ динамики элиминации плазмид показал, что к 3-м суткам количество плазмид, введенных обоими методами, уменьшается во всех культурах на 30-69%. В дальнейшем с 3-х по 9-е сутки количество плазмид в культурах не различалось. Уровни экспрессии целевого гена не коррелировали с количеством плазмид в клетках и варьировали в контрольных и трансфицированных обоими методами клетках от 2 до 10 раз. Авторы пришли к выводу, что колебание уровней экспрессии VEGF не обусловлено метилированием (Смирнихина С.А. и др., 2011).

1.4.2. Вектор LP1

Создана управляемая невирусная генная конструкция для трансфекции клеток млекопитающих, в которой в качестве управляющего элемента используется промотор белка теплового шока hsp 70 дрозофилы – вектор LP1. Полилинкер данного вектора позволяет создавать химерные конструкторы с маркерным флуоресцентным геном на N конце. Эмбриональные стволовые клетки мыши (линия R1) трансфицировали конструкцией, содержащей голубой флуоресцентный белок под контролем упомянутого промотора дрозофилы. Экспрессия репортерного белка наблюдалась только после краткосрочного (20 минут) нагревания трансфицированных клеток до +42° С.

Полученный вектор позволит использовать дрозофильные промоторы

для создания конструкций, трансформирующих стволовые клетки с целью их последующего использования в клеточной терапии (Ревущин А.В. и др., 2007).

1.4.3. Химическая трансфекция

Одним из распространённых подходов для химической трансфекции разных эукариотических клеточных линий считается применение катионных липидов или полимеров. Метод основан на образовании липосомных комплексов, способных проникать сквозь плазматическую мембрану клеток. Преимуществом метода считается его относительная простота и доступность необходимого оборудования. Эффективность низкомолекулярных полиэтилениминов для трансфекции невирусных систем показана для гемопоэтических клеточных линий и CD34⁽⁺⁾-клеток пуповинной крови человека (Shin J.Y. et al., 2005). Более того, клетки, трансфицированные с помощью низкомолекулярных полиэтилениминов, показали хорошую жизнеспособность. Сравнение эффективности трансфекции клеток с помощью полиэтилениминов и реагента Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США), который применяется для химической трансфекции эукариотических клеток и используется многими научными коллективами в качестве стандарта, показало более высокий уровень экспрессии гена EGFP (до 23 раз) в различных клеточных культурах, включая CD34⁽⁺⁾-клетки пуповинной крови (после трансфекции с помощью полиэтилениминов).

Экспрессия трансгенов в нейральных и стромальных СК/МСК может значительно повысить их терапевтический потенциал. В экспериментах по трансфекции авторами рассмотрены свойства линейных и разветвленных (дендримеры) поликатионов как агентов доставки трансгена. Линейный полиэтиленимин трансфицировал нейроны, но был мало эффективен в отношении МСК. Полиамидаминные дендримеры продемонстрировали большую эффективность трансфекции и среднюю интенсивность флюоресценции GFP по сравнению с фосфорными дендримерами того же (4-го) поколения. Экспрессия нейротрофического фактора BDNF в МСК при трансфекции полиамидаминных дендримеров была также более чем в 10 раз выше (Шахбазов А.В. и др., 2011).

1.4.4. Электропорация

Электропорация является одним из самых универсальных методов физической доставки генетического материала в различные эукариотические клеточные культуры (Исламов Р.Р. и др., 2007). В нескольких лабораториях успешно продемонстрировали возможность применения электропорации для генетической модификации гемопоэтических клеток и CD34⁽⁺⁾-клеток пуповинной крови. Путём электропорации проведена трансфекция репортерной конструкции, содержащей ген EGFP, в свежeweделенные CD34⁽⁺⁾-клетки пуповинной крови человека (von Levetzow G. et al., 2006) Установлена 80%-я эффективность трансфекции клеток при высоких

вольтамперных параметрах эксперимента, но этот результат был получен лишь с 50%-й выживаемостью клеток. Увеличение ёмкости электрического импульса и/или концентрации ДНК приводит, с одной стороны, к повышению эффективности электропорации, с другой - к понижению выживаемости клеток. Более щадящие параметры электропорации позволили повысить жизнеспособность клеток при трансфекции. Была достигнута 41,2%-я эффективность электропорации CD34⁽⁺⁾-клеток пуповинной крови без значительного снижения жизнеспособности клеток (Oldak T. et al., 2002). M. Jurga et al. (2006) успешно использовали электропорацию для введения плазмиды, экспрессирующей белок EGFP, в нейральные стволовые клетки, дифференцированные при культивировании клеток пуповинной крови человека.

Проведена доставка плазмидной ДНК и интерферирующих рибонуклеиновых кислот в стромальные клетки жировой ткани с помощью липофекции, кальций-фосфатного метода и электропорации. При введении в клетки плазмидной ДНК с помощью кальций-фосфатного метода и липофекции доля трансфицированных клеток составила 0 и 15% соответственно, при электропорации – более 50%. Сходные результаты получены и при введении в клетки короткоцепочечных рибонуклеиновых кислот. Полученные данные указывают на то, что электропорация является наиболее эффективным способом невирусной трансфекции стромальных клеток жировой ткани (Лопатина Т.В. и др., 2009).

1.4.5. Передача РНК и белков через мембранные везикулы

Поддержание плюрипотентности и недифференцированного состояния эмбриональных клеток, так же как и нормальное развитие, требует устойчивых клеточных контактов (Cole F. et al., 2004; Parker M.A. et al., 2004). Клетки взаимодействуют посредством секретируемых факторов роста, цитокинов, адгезивных молекул и «малых медиаторов», таких как нуклеотиды или биоактивные липиды. Во взаимодействии клеток важную роль играют мембранные везикулы (membrane-derived vesicles, MV), которые образуются на поверхности активированных клеток, содержат многочисленные белки и липиды этих клеток, воздействуют на другие клетки через поверхностные лиганды (Janowska-Wieczorek A. et al., 2001; Morel O. et al., 2004).

Поддержание недифференцированного состояния, также как и индукция развития, управляются межклеточными взаимодействиями через молекулы мембран посредством мембранных везикул эмбриональных стволовых клеток (ESC-MV), которые также содержат мембранные везикулы (Landsverk H.B. et al., 2002; Do J.T. et al., 2004) со специфическими «стволовыми факторами». ESC-MV, выделяющиеся в среду, повышают жизнеспособность и вызывают экспансию гемопоэтических клеток (HPC), усиливают экспрессию ранних «стволовых» (Oct-4, Nanog и Rex-1) и гемопоэтических (Scl, НохВ4 и GATA 2) маркеров. Добавление низкой концентрации ESC-MV

в среду способствовало поддержанию и увеличению количества колониобразующих клеток, защите гемопоэтических клеток от апоптоза.

Факторы Wnt-3 и Oct-4 играют центральную роль в жизнедеятельности стволовых клеток и их поддержании в недифференцированном состоянии (Reya T. et al., 2003; Sato N. et al., 2004). Крысиные и человеческие ESC-MV богаты белком Wnt-3 и mRNA некоторых транскрипционных факторов, поддерживающих плюрипотентность (Oct-4, Rex-1, Nanog, SCL, GATA-2 и GATA-4). ESC-MV могут передавать свое содержимое нормальным соседним клеткам (физиологическая липофекция). ESC-MV содержат не только мРНК гена *Oct-4*, но и сам белок. В клетках происходит трансляция Oct-4 с мРНК, принесенной ESC-MV. При слиянии с клетками-мишенями ESC-MV могут доставлять мРНК в эти клетки, и тем самым индуцировать в них эктопическую экспрессию генов. ESC-MV могут увеличивать мультипотентность НРС, благодаря горизонтальному переносу мРНК и белков из эмбриональных стволовых клеток. *In vivo* при добавлении ESC-MV индуцируется экспрессия специфических транскрипционных факторов и увеличивается количество колониобразующих клеток. Эти данные могут свидетельствовать о том, что ESC-MV стимулируют деление клеток и увеличивают их мультипотентность.

Таким образом, MV, полученные от ESC (ESC-MV), содержат различные, специфические для стволовых клеток молекулы, в том числе и трансмембранные, которые могут воздействовать на рост и развитие, а также поддерживать самообновление и «стволовость» окружающих клеток *in vitro* (Лопатина Т.В., 2006в; Nakelien A.M. et al., 2002; Do J.T. et al., 2004; Sato N. et al., 2004).

1.5. Модуляция активности факторов плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток (Nanog, Oct4 и Sox2) с помощью микроРНК

МикроРНК – это короткие последовательности из 20-25 рибонуклеотидов, основной функцией которых является подавление трансляции определенных матричных РНК (мРНК), что приводит к остановке синтеза белка (Elbashir S.M. et al., 2001; Bartel D.P., 2004;). МикроРНК являются одним из основных регуляторов экспрессии генов. Считается, что микроРНК связываются с нетранслируемыми областями мРНК, что справедливо для большинства микроРНК (Hammond S.M., 2005) за небольшим исключением (Okumura-Nakanishi S. et al., 2005; Pan G. et al., 2006).

Предположена возможность существования многочисленных специфических сайтов связывания микроРНК в пределах мРНК (Miranda K.C. et al., 2006). В качестве модельных генов были выбраны *Nanog*, *Oct4* и *Sox2*, которые кодируют три основных фактора плюрипотентности мышинных эмбриональных стволовых клеток, а также определяют начало их дифференцировки (Bentwich I., 2005; Rajewsky N., 2006). Авторы

индуцировали дифференцировку ЭСК линии E14 с помощью ретиноевой кислоты и обнаружили, что спустя некоторое время происходит существенное повышение количества в клетке лишь трех микроРНК из всех известных: miR-296, miR-470 и miR-134. Каждая из микроРНК связывается сразу с несколькими сайтами на мРНК белков *Nanog*, *Oct4* и *Sox2*, а именно:

- miR-296 имеет два комплементарных участка на мРНК *Nanog*;
- miR-470 связывается с шестью сайтами на мРНК *Nanog* и с тремя сайтами на мРНК *Oct4*;
- miR-134 имеет пять последовательностей-мишеней на мРНК *Sox2*.

Такое количество сайтов связывания предполагает, что эти три микроРНК могут регулировать процессы поддержания плюрипотентности и дифференцировки ЭСК в разных вариантах в зависимости от уровня их экспрессии и соотношений.

МикроРНК miR-134, подавляя экспрессию генов *Nanog*, *Oct4* и *Sox2*, запускают дифференцировку ЭСК (Tay Y.M. et al., 2008).

При блокировании в ЭСК функционирования микроРНК, клетки практически переставали реагировать на индукцию дифференцировки с помощью ретиноевой кислоты.

МикроРНК играют ключевую роль в дифференцировке ЭСК и, таким образом, являются факторами, регулирующими процесс эмбрионального развития на самых ранних его этапах. Связываясь с большим числом сайтов на мРНК, они могут осуществлять сложные взаимодействия со своими мишенями, реализуя, по-видимому, видоспецифическую программу развития ЭСК.

В последние годы, по данным US Public Library of Medicine (<http://www.pubmed.com>), по изучению микроРНК проведено более тысячи работ в самых разных областях – от биологии старения и фундаментальных вопросов эмбриогенеза до онкологии и других клинических направлений. Видимо, в последующие несколько лет интерес к этим небольшим молекулам не ослабнет, так как их роль в решении фундаментальных и прикладных проблем биологии и медицины очевидна (Григорян А.С., 2008).

Nanog является ключевым фактором на финальных стадиях формирования плюрипотентного статуса. Ученые из Великобритании – Остин Смит (Austin Smith) и Ян Чемберс (Ian Chambers) несколько лет плодотворно сотрудничают, исследуя плюрипотентные клетки и, в частности, роль гомеобоксного белка *Nanog*. Они вместе с коллегами из Эдинбургского университета впервые охарактеризовали этот транскрипционный фактор (Chambers I. et al., 2003). Независимо и одновременно с ними показали особую роль *Nanog* в эмбриональных стволовых клетках японские исследователи во главе с Синъя Яманака (Shinya Yamanaka) (Mitsui K. et al., 2003). И хотя приоритета в открытии *Nanog* у британцев нет, своим необычным названием этот фактор обязан шотландцу по происхождению Яну Чемберсу. Ян Чемберс назвал его *Nanog* в честь кельтской мифической земли вечной юности – *Tír na nÓg*.

Экспрессия *Nanog* является специфичной для плюрипотентных клеток. Кроме клеток внутренней клеточной массы и эмбриональных стволовых клеток *Nanog* обнаружен только в развивающихся герминативных тканях млекопитающих. Делеция *Nanog* приводит к ранней доимплантационной гибели эмбриона, а его сверхэкспрессия в мышинных ЭСК – к автономии от цитокина LIF при культивировании (Mitsui K. et al., 2003). Согласно устоявшемуся мнению, *Nanog*, наряду с такими факторами, как Oct4 и Sox2, находится в центре транскрипционной сети плюрипотентной клетки (Boyer L. A. et al., 2005). Повышение экспрессии *Nanog* делает более эффективным перепрограммирование путем слияния ЭСК и нейральных стволовых клеток (Silva J. et al., 2006).

Несмотря на это, *Nanog* не относится к транскрипционным факторам (Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4), трансфекция которыми приводит к перепрограммированию соматических клеток и получению клеток с индуцированной плюрипотентностью (iPS-клетки). Занимая одно из ключевых мест в иерархии регуляторных генов плюрипотентности, *Nanog* экспрессируется в ЭСК со значительной вариабельностью – вплоть до полного отсутствия экспрессии в отдельных клетках. Делеция гена в эмбриональных стволовых клетках не приводит к переключению к дифференцировке, а лишь к получению линии ЭСК, имеющей повышенную склонность «уходить» в дифференцировку, но в норме обладающих всеми признаками плюрипотентности (Chambers I. et al., 2007).

Nanog нужен на финальных стадиях формирования плюрипотентного статуса, когда все остальные ключевые факторы плюрипотентности уже активированы. Экспрессия *Nanog* равно необходима как в конце процесса получения iPS-клеток, так и для формирования пула плюрипотентных клеток в мышинном эмбрионе (Silva J. et al., 2009).

Наиболее показательна необходимость *Nanog* для перехода от недифференцированного состояния клеток к плюрипотентности при соматическом перепрограммировании нейральных стволовых клеток (НСК) с трансфекцией факторами Oct4, Klf4 и c-Myc и использованием ингибиторов двух киназ: митоген-ассоциированной протеин-киназы и GSK-3-киназы (Silva J. et al., 2008). При таком подходе можно разделить процесс индукции плюрипотентности на две стадии.

При трансфекции транскрипционными факторами происходит дедифференцировка, но отсутствует реактивация X-хромосомы в женских клетках, нет устойчивой экспрессии Oct4 и *Nanog*, нет способности формировать ткани взрослого химерного организма. При последующем вводе в среду ингибиторов вышеуказанных киназ и LIF происходит окончательное приобретение всех признаков плюрипотентной клетки. Было использовано две линии клеток: линия НС клеток с делетированным *Nanog* и эта же линия, в клетки которой введен конститутивно-экспрессирующийся вектор с *Nanog*. При трансфекции Oct4, Klf4 и c-Myc происходила успешная

дифференцировка клеток обеих линий, а введение ингибиторов и LIF приводило к завершению только у экспрессирующей *Nanog* линии.

Вторая линия доказательств включала наблюдение за экспрессией *Nanog* и *Oct4*, а также статусом X хромосомы между 3-5-ми сутками эмбрионального развития мышины самки. В этих исследованиях проводили сравнение за развитием эмбрионов с генотипом $\text{nanog}^{(+)}/\text{nanog}^{(+)}$, $\text{nanog}^{(+)}/\text{nanog}^{(-)}$ и $\text{nanog}^{(-)}/\text{nanog}^{(-)}$. Как известно, для всех линий ЭСК мыши характерен активный статус обеих хромосом у клеток с кариотипом 40,XX, а такой статус X-хромосом является одной из определяющих характеристик клеточной плюрипотентности у самок мышей. В качестве эпигенетического маркера неактивной X-хромосомы использовали Eed-белок. О наличии молчащей X-хромосомы свидетельствует присутствие в клеточном ядре яркого фокуса при иммуногистохимическом окрашивании с использованием антител к Eed.

До 3,5 суток развития эмбрионы с различным генотипом не имели различий в морфологии, а во всех клетках выявлялся фокус окрашивания Eed. На 4-5-е сутки происходила реактивация X-хромосомы только в тех эмбрионах, которые имели ген *Nanog*. Реактивация X-хромосомы была обнаружена только в тех клетках, которые экспрессируют не только *Oct4*, но и *Nanog*. Такие клетки занимают центральное положение во внутренней клеточной массе бластоцисты, и, по мнению авторов, соответствуют эпибласту. Эмбрионы $\text{nanog}^{(-)}/\text{nanog}^{(-)}$ имели сниженное количество клеток во внутренней клеточной массе, и у них отсутствовал компартмент эпибласта.

Эти и другие свидетельства, приведенные в статье, говорят о том, что *Nanog* необходим на окончательной стадии формирования плюрипотентного статуса клеток как при нормальном эмбриональном развитии, так и при соматическом перепрограммировании. При этом экспрессия *Nanog* не является принципиальной ни на первых этапах становления плюрипотентности, ни по завершении этого процесса. Авторы исследования считают, что *Nanog* координирует уже существующую активность ключевых генов и белков, заставляя их работать в согласованном режиме, что обуславливает переход к самоподдерживающемуся состоянию плюрипотентности. Следующей задачей является изучение способа подобного управления *Nanog*.

Следует отметить, что приведенные факты относятся только к мыши и неизвестно насколько выводы, сделанные авторами в отношении роли *Nanog*, приложимы к плюрипотентным клеткам человека. В частности, существуют данные, что в отличие от мышинных клеток добавление *Nanog* к факторам *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* и *Klf4* повышает эффективность получения iPS-клеток человека (Yu J. et al., 2007), что может говорить о более раннем участии *Nanog* в процессе перепрограммирования соматических клеток человека. Данная работа проясняет функциональную роль *Nanog* и демонстрирует симметричность финальных процессов, происходящих при естественном

возникновении плюрипотентных клеток в бластоцисте и при их искусственном получении в виде iPS-клеток (Богомазова А.Н., 2010).

1.6. Генетическая модификация стволовых клеток пуповинной крови

В качестве дальнейшей разработки клеточной терапии представляет интерес использование и других, менее опасных в плане возможной опухолевой трансформации, стволовых клеток. Более перспективными в этом смысле являются стволовые клетки пуповинной крови.

Основанием для трансплантации стволовых клеток пуповинной крови с целью стимуляции регенерации является их пригодность как для алло-, так и для ауто трансплантации у человека, их низкая иммуногенность, доступность, простота получения и хранения. В пуповинной крови присутствуют стволовые клетки, способные давать начало специализированным клеткам разных тканей.

Проведены экспериментальные работы по трансплантации генетически модифицированных клеток пуповинной крови для стимуляции регенерации сердечной мышцы и сосудов. Большое внимание уделяется возможности трансплантации клеток пуповинной крови, генетически модифицированных человеческим геном VEGF, что активирует ангиогенез в тканях при моделировании хронической ишемии конечностей у крысы и инфаркта миокарда у мышей.

Получение и испытание генетически модифицированных клеток пуповинной крови позволяет тестировать эффективность конкретных подходов: применение различных клеточных типов пуповинной крови, разные генетические модификации клеток перед трансплантацией, варианты по срокам и количеству клеток, способу введения клеток – непосредственно в область травмы, в кровь, в биоматрикс.

Предстоит экспериментальное обоснование целесообразности трансплантации генетически модифицированных, трансфицированных плазмидными векторами, экспрессирующими гены нейрональной молекулы адгезии L1, поддерживающей выживание нейронов и рост аксонов, сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF стволовых клеток пуповинной крови при нейродегенеративных заболеваниях, в частности, при боковом амиотрофическом склерозе, для более выраженного трофического эффекта на мотонейроны головного и спинного мозга.

Нейротрофическое действие VEGF осуществляется через рецептор Flk-1 и поддерживает выживание нейронов. На модели экспериментальной травмы спинного мозга VEGF в гелевом носителе на основе экстракта белков базальной мембраны существенно поддерживает васкуляризацию и рост аксонов.

Однако клиническое применение для нейротрансплантации стволовых клеток пуповинной крови требует дополнительных экспериментальных исследований с учётом их трансдифференцировки в разные клеточные типы

(Семченко В.В. и др., 2000, 2004). При этом генетическая модификация стволовых клеток пуповинной крови может быть полезна в двух аспектах: для направленной дифференцировки клеток и ограничения возможности их злокачественной трансформации; для доставки специфических ростовых и трофических факторов, поддержания устойчивости нервных клеток при нейропатологии (Исламов Р.Р. и др., 2007).

1.7. Перепрограммирование генома дифференцированных клеток

1.7.1. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPS-клетки) без векторной интеграции

В настоящее время активно ведутся исследования в области получения плюрипотентных соматических клеток животных и человека. Принципиально описаны два пути, посредством которых это может быть достигнуто: использование методов клонирования (например, клеточного слияния, переноса ядер соматических клеток в овоцит второго деления мейоза (somatic cell nuclear transfer – SCNT) и индукция репрограммирования с получением индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (induced pluripotent stem cells – iPS cells), сходных с ЭСК. К настоящему времени уже получены iPS-клетки мышей и человека, а методом SCNT клонирован целый ряд животных от грызунов до приматов.

Схема репрограммирования предполагает внедрение в клетки исходной культуры дифференцированных клеток генов плюрипотентности, сверхэкспрессия которых призвана вернуть дифференцированную клеточную популяцию к плюрипотентному состоянию. В качестве индукторов репрограммирования К. Takahashi и S. Yamanaka (2006) предложили квартет транскрипционных факторов, выявленных ими из 24 претендентов: Oct4, Sox2, с-Мус, Klf4. Oct4 и Sox2 являются ключевыми факторами регуляции пролиферации и плюрипотентности стволовых клеток и характеризуются высоким уровнем экспрессии в ЭСК, снижающимся в процессе дифференцировки. Вовлечение Klf4 и с-Мус в процессы репрограммирования может быть связано с их ролью в качестве модификаторов хроматина, способствующих активации Oct4 и Sox2.

Ж.А. Thomson et al. (2007) на начальном этапе исследования выбирали гены, необходимые для инициации репрограммирования, из 14 кандидатов и в результате заменили Klf4 и с-Мус, входящие в стандартный набор транскрипционных факторов «стволовости», на Nanog и Lin28. Роль Nanog, наряду с Oct4 и Sox2, общепризнанна в индукции плюрипотентности соматических клеток, тогда как существенная значимость Lin28 в репрограммировании не подтверждена. Необходимость замены с-Мус обусловлена индукцией им апоптоза ЭСК человека, а также стимуляции в 20% случаев опухолевой трансформации iPS-клеток мышей при реактивации соответствующей области ретровирусного вектора.

Для подтверждения полипотентного статуса в исследованиях выполнялась подкожная трансплантация iPS-клеток. В местах инъекций развивались «тератомы», состоящие из комплекса тканей, морфологически сходных с производными всех трех зародышевых листков.

Получение iPS-клеток человека, сходных по морфологическим, иммуногистохимическим и генетическим критериям с ЭСК человека, является первым значительным достижением в области получения аутогенных плюрипотентных клеток путем репрограммирования соматических клеток человека (Григорян А.С., 2009б).

1.7.2. Индукция репрограммирования ядра соматической клетки «генами маркерами плюрипотентности»

При реализации феномена репрограммирования ядра взрослой соматической клетки под влиянием неизвестных факторов в ядре соматической клетки происходит активация генов раннего эмбриогенеза и ингибирование генов, ответственных за дифференцировку и специализацию. При полном репрограммировании «стирается» как специализированная генетическая, так и эпигенетическая информация, и клетка приобретает свойство плюрипотентности.

Полное репрограммирование соматической клетки происходит при переносе ее ядра в энуклеированную неоплодотворенную яйцеклетку (технология клонирования) и при слиянии взрослой специализированной клетки с ЭСК (Tada M. et al., 2001; Cowan C.A. et al., 2005). Остаются неизученными механизмы и факторы, обуславливающие реализацию этого биологического феномена. Одним из ключевых факторов репрограммирования ядра взрослой клетки может быть ген *Nanog* (Silva J. et al., 2006).

Исследовательская группа К. Takahashi и Shinya Yamanaka (2006) предположила, что искусственно индуцированная избыточная экспрессия «генов плюрипотентности», описанных как факторы поддержания «стволовости» в ЭСК, может стимулировать процесс репрограммирования взрослой клетки до эмбриональной. Для проверки гипотезы авторы проводили трансфекцию изолированными генами–кандидатами 2 типов клеток – эмбриональных и взрослых фибробластов мыши. Всего было выбрано 24 гена–кандидата, среди них гены самообновления, а также гены активные в опухолевых клетках и ЭСК, описанных в некоторых работах и из библиотеки *in silico* (*Oct3/4*, *Sox2*, *Nanog*, *c-Myc*).

Одновременное введение всех 24 генов приводило к активации промотера, активного только в ЭСК (*Fbx15*), и появлению антибиотик–селективных колоний. Введение каждого гена по отдельности не приводило к росту ЭСК-подобных колоний. Последовательными экспериментами авторы «сузили» окно искомых генов сначала до 10 (iPS-MEF10 клетки), а потом до 4 (iPS-MEF4) – *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* и *Klf4*.

Все эти факторы описаны и известны как определяющие и поддерживающие самообновление и «стволовость» ЭСК (Boyer L.A. et al., 2005; Cartwright P. et al., 2005; Li Y., 2005). IPS-MEF4 клетки, полученные из эмбриональных фибробластов, обладали типичными свойствами ЭСК – имели подобную морфологию и рост в культуре с формированием эмбрионидных телец, образовывали тератомы в классическом *in vivo* тесте, были способны к мультидифференцировке. Другим важным доказательством эффективности метода репрограммирования стал эксперимент по получению ЭСК-подобных колоний из взрослых фибробластов индукцией 4 вышеуказанных генов (iPS-TTF4) и демонстрация их плюрипотентности формированием тератом *in vivo*, а также химеризация эмбриона при их инъекции в бластоцисту.

Эффективность формирования ЭСК-подобных колоний не зависела от введения гена *Nanog* – первого и значительного фактора-кандидата, обуславливающего феномен репрограммирования (Silva J. et al., 2006). В комментарии к статье К.Т.Родольфа и К.Егган указывают, что полученные клетки нельзя назвать абсолютно идентичными ЭСК, а репрограммирование – полным. На это указывают факты отсутствия постнатальной химеризации животных после инъекции в бластоцисту, увеличение разницы в карте генной экспрессии на микрочипах при пассировании клонов по сравнению с контрольными ЭСК (например, отсутствие экспрессии *Ecat1*), различный уровень метилирования Oct3/4-промотора, говорящий о неполном эпигенетическом репрограммировании. Поэтому, по сравнению с другими методами, уровень репрограммирования фибробластов в работе остаётся неполным, и, возможно, iPS-клетки более похожи на клетки эмбриональной карциномы (ЕСС), но не идентичны ЭСК (Rodolfa K.T. et al., 2006).

Тем не менее, эксперименты К. Takahashi et al. (2006) чётко указывают на перспективность такого методического подхода для тестирования возможных факторов репрограммирования в эксперименте. Авторы впервые показали, что метод применим для индукции репрограммирования взрослой дифференцированной соматической клетки (на примере взрослого фибробласта мыши) и выявили 4 новых фактора, обуславливающих этот феномен. Остаётся неизвестным значение в репрограммировании каждого фактора в отдельности; приведёт ли к полному репрограммированию взрослой терминально дифференцированной клетки добавление ещё одного-двух каких-либо факторов и каких; будет ли этот метод работать на других типах соматических клеток и у человека (Берсенев А.В., 2006).

1.7.3. Перепрограммирование соматических клеток с помощью аденовирусных и плазмидных неинтегрирующихся векторов

В процессе развития организма реализуется онтогенетическая программа, в результате выполнения которой клетки постепенно утрачивают потенциал дифференцировки. Однако, в целом ряде исследований показано,

что цитоплазматических и ядерных факторов, содержащихся в плюрипотентной клетке, достаточно для репрограммирования генома соматической клетки до плюрипотентного состояния. С помощью транскрипционных факторов, которые напрямую вовлечены в поддержание плюрипотентности, разработана технология получения клеток с индуцированной плюрипотентностью (iPS-клетки).

Благодаря обнаружению молекулярных факторов, ответственных за поддержание плюрипотентного статуса ЭСК (*Oct4*, *Sox2*, *Nanog*), стала возможной направленная генетическая модификация дифференцированных клеток с целью перепрограммирования их генома и возврата к плюрипотентному состоянию. Плюрипотентные клетки, полученные из мышинных фибробластов в результате ретровирусной трансфекции четырех генов – *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* и *Klf4*, японские ученые К. Takahashi и S. Yamanaka (2006) и назвали индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (iPS-клетками). Такие iPS-клетки, полученные из различных соматических клеток мышей и человека, по ряду принципиальных характеристик (например, эпигенетический статус, транскрипционный профиль, формирование тератом при трансплантации иммунодефицитным мышам, в случае мышинных iPS-клеток – введение в бластоцисту с последующим образованием животных-«химер») сходны с ЭСК, полученными из бластоцист. Говорить об истинной ценности данной технологии для клинической практики, очевидно, рано. Одно из ключевых препятствий – использование вирусных векторов, интегрирующихся в клеточный геном, а также протоонкогенов в качестве трансгенов (*c-Myc*, *Klf4*), что может приводить к малигнизации iPS-клеток.

Чтобы снизить риск онкотрансформации iPS-клеток, протоонкогены *c-Myc* и *Klf4* могут быть заменены на гены *Nanog* и *Lin28*, либо можно ограничиться трансфекцией трех (*Oct4*, *Sox2* и *Klf4*) или даже двух (*Oct4*, *Sox2*) генов плюрипотентности. Эффективность процедуры перепрограммирования, исходно составлявшая около 0,01% (10-20 колоний iPS-клеток на 100 тысяч фибробластов), может быть повышена на 1 порядок за счет совместной трансдукции обоих предложенных «квартетов» генов. Аналогичное по уровню увеличение выхода колоний iPS-клеток наблюдается при дополнительной трансфекции генов теломеразы TERT и большого Т-антигена вируса SV4.

Тем не менее, проблема использования вирусных векторов, интегрирующихся в клеточный геном, служит основной причиной опасений, связанных со степенью надежности и безопасности применения перепрограммированных iPS-клеток в терапии (Saito Y. et al., 2005).

Интеграция вектора – неконтролируемый процесс, который ассоциирован с риском развития новообразований в результате спонтанной реактивации вирусных трансгенов, а также вследствие встраивания вектора вблизи потенциальных протоонкогенов. Кроме того, полагают, что инсерционный мутагенез может служить необходимым стимулом,

запускающим клеточное перепрограммирование *in vitro*. Например, вектор может интегрироваться около генов, контролирующих плюрипотентный статус, тем самым обеспечивая их активацию. Хотя анализ ограниченного числа инсерционных сайтов в iPS-клетках подтвердил случайный характер встраивания вектора, возможность индукции перепрограммирования в результате векторной интеграции всё же не может быть полностью исключена (Saito Y. et al., 2005).

Исследования M.Stadtfield et al. (2008) и K.Okita et al. (2007) продемонстрировали возможность использования не способных к интеграции векторов (аденовирусных, аденовирусных и плазмидных) для получения мышинных iPS-клеток. В итоге было показано, что инсерционный мутагенез не оказывает какого-либо значимого влияния на эффективность перепрограммирования клеток. Обе исследовательские группы наглядно продемонстрировали возможность формирования плюрипотентных iPS-клеток без интеграции трансгенов в геном соматической клетки.

Плюрипотентность полученных iPS-клеток подтверждена хорошо известными молекулярными и функциональными тестами. Действительно, iPS-клетки экспрессировали характерный для ЭСК профиль генов плюрипотентности (*Nanog*, *ECAT1*, *Rex1*, *Fbx15*), формировали тератомы при введении иммунодефицитным SCID мышам и давали начало здоровым химерным животным после трансплантации отдельных iPS-клеток в бластоцисту.

K.Okita et al. (2007) изучили происхождение полученных iPS-клеток, чтобы исключить возможность контаминации образцов ЭСК, несущими репортерный *Nanog*-GFP трансген. Метод SSLP (Simple Sequence Length Polymorphism) показал, что iPS-клетки формируются именно из линий мышинных эмбриональных фибробластов, а не из стволовых клеток, присутствующих среди дифференцированных фибробластов, хотя перепрограммировать соматические стволовые клетки в iPS-клетки значительно легче, нежели дифференцированные.

Таким образом, в обеих работах установлено, что iPS-клетки могут быть получены без использования интегрирующихся векторов, хотя и в значительно меньшем количестве, почти на два порядка ниже, чем при использовании интегрирующихся векторов.

Исследования Stadtfield M. et al. (2008) и K.Okita et al. (2007) стали существенным шагом к направленному получению плюрипотентных стволовых клеток без использования методов, существенным недостатком которых является потенциальная дестабилизация клеточного генома. Таким образом, перепрограммирование соматических клеток без векторной интеграции может стать ведущим направлением в получении iPS-клеток – одной из главных, и, несомненно, самой популярной на сегодняшний день альтернативы эмбриональным стволовым клеткам (Киселев С.Л., 2010; Stadtfield M. et al., 2008).

1.7.4. Индукция iPS-клеток из нейральных стволовых клеток с помощью комбинации двух транскрипционных факторов

В большинстве научных исследований для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (induced pluripotent stem cells – IPS cells), независимо от используемой исходной клеточной популяции (например, фетальные или взрослые кожные фибробласты, синовиоциты), применяется стандартный набор факторов, включающий Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4, Nanog, Lin28, высокий уровень экспрессии которых характерен для ЭСК (Takahashi K. et al., 2007; Yu J. et al., 2007).

С учетом негативного эффекта реактивации c-Myc в виде индукции апоптоза (Sumi T. et al., 2007) и опухолевой трансформации iPS-клеток (Okita K. et al., 2007), актуальной стала разработка протоколов получения iPS-клеток с уменьшением количества факторов репрограммирования повышения безопасности применения культур iPS-клеток в клинических испытаниях. В связи с этим проведено репрограммирование нейральных стволовых клеток (НСК) с использованием всего двух факторов (например, Oct4-Klf4) (Kim J. V. et al., 2008). Соответствие полученных iPS-клеток и ЭСК доказали по стандартному плану, предусматривающему изучение морфологии, иммунофенотипа, генетических характеристик, наличия тератом при подкожном введении.

Оказалось, что к формированию колоний iPS-клеток приводят лишь два варианта: наиболее быстро – Oct4-Klf4, а на одну-две недели медленнее – Oct4-c-Myc. Авторы сравнивали свойства клеточных культур, полученных при использовании Oct4-Klf4 и квартета факторов между собой, а также с ЭСК. Установили, что морфологически идентичные колонии различных клеточных популяций характеризуются сходным уровнем экспрессии генов – маркеров ЭСК (*Oct4*, *Nanog*, *Sox2*, *Fgf4*, *Eras*, *Cfcl*, *Zfp42*, *Utf1*, *Dppa5a*), а также были позитивны по SSEA-1. Кроме того, методом ПЦР с обратной транскрипцией показано, что iPS-клетки, полученные при использовании двух индукторов, и ЭСК характеризуются одинаковыми уровнями экспрессии эндогенных *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* и *Klf4* с тысячекратным понижением активности ретровирусных факторов через 30 дней после трансфекции.

Плюрипотентность сравниваемых культур iPS-клеток была подтверждена формированием эмбрионидных телец, дифференцировкой в кардиомиоциты, образованием подкожных тератом, клетки которых экспрессировали маркеры эктодермальной (*Tuj1*), энтодермальной (*AFP*) и мезодермальной (*Flk1*) принадлежности. Инъекция iPS-клеток, полученных при репрограммировании двумя факторами, в диплоидные и тетраплоидные бластоцисты приводила к формированию химер, которые в первом случае были жизнеспособны.

Таким образом, показана возможность репрограммирования соматических клеток (НСК) всего двумя факторами за счет эндогенной

экспрессии остальных. Особенно важно, что положительные результаты достигаются и без применения ретровирусных векторов, содержащих с-Мус, который вносит существенный вклад в опасность опухолевой трансформации iPS-клеток (Бозо И.Я., 2008).

1.7.5. Метод получения iPS-клеток с помощью рекомбинантных белков

В 2006-2007 годах было показано, что у соматических клеток мыши и человека может быть индуцировано плюрипотентное состояние с помощью ретровирусной трансдукции генов четырех факторов: *Oct4*, *Klf4*, *Sox2* и *Nanog* (Takahashi K. et al., 2006, 2007; Yu J. et al., 2009). Разработан надежный и воспроизводимый метод для получения линий аутогенных плюрипотентных стволовых клеток, которые могут применяться для клеточной терапии разных заболеваний. В то же время, внесение в клетку чужеродного генетического материала ретровирусов может быть потенциально опасным, так как сопровождается высоким риском злокачественной трансформации при трансплантации производных таких плюрипотентных клеток в организм реципиента (Yamanaka S. et al., 2009).

До этого был разработан ряд методов получения iPS-клеток, не требующих встраивания в их геном чужеродной ДНК:

- внесение в соматическую клетку необходимых генов в составе векторов на основе аденовирусов, не интегрирующихся в геном (Stadtfield M. et al., 2008);

- применение плазмид, которые спонтанно удаляются из клеток после их перепрограммирования и многократного деления (Okita K. et al., 2008);

- применение в качестве носителя генов плюрипотентности транспозона PiggyBac, который также спонтанно удаляется из клеток после их перепрограммирования (Woltjen K. et al., 2009; Kaji K. et al., 2009).

- внесение в клетку генов плюрипотентности в составе интегрирующихся в геном вирусов, которые затем удаляются из хромосом при помощи рекомбиназы Cre (Soldner F. et al., 2009);

- а также использование неинтегрирующихся в геном плазмидных векторов на основе ядерного антигена-1 вируса Эпштейн-Барр (Yu J. et al., 2007).

Тем не менее, ни один из перечисленных методов в действительности не исключает необходимости внесения в клетку чужеродного генетического материала, пусть и не встраиваемого непосредственно в ядерную ДНК.

H.Michiue et al. (2005) и M.Inoue et al. (2006) считают, что для получения iPS-клеток, по свойствам неотличимых от эмбриональных стволовых клеток, достаточно привнесение в ядро клетки не самих генов плюрипотентности, а их продуктов с помощью короткого пептида полиаргинина (11R), который присоединяли к С-концу белков *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и с-Мус. Рекомбинантные белки экспрессировались в культурах *E. coli*,

затем их выделяли, очищали и идентифицировали с помощью масс-спектрометрии и Вестерн-блот гибридизации. После этого полученные белки в разных концентрациях добавляли в культуральную среду к мышинным эмбриональным фибробластам для успешной транслокации в ядра клеток в течение 6 часов в концентрациях от 0,5 до 8 мкг/мл. При этом белки в клетке оставались стабильными в течение 48 часов.

Поскольку для репрограммирования соматических клеток в плюрипотентные требуется экспрессия факторов плюрипотентности в течение 7-10 суток, авторы разработали протокол, по которому клетки, меченные геном флуоресцентного белка GFP (ген *Gfp* был встроен в геном клеток под промотором гена *Oct4*; соответственно, белок GFP начинал продуцироваться при экспрессии *Oct4*), по 12 часов культивировали в среде, содержащей 8 мкг/мл рекомбинантного белка и 1мМ вальпроевой кислоты – вещества, значительно повышающего эффективность репрограммирования клеток (Huangfu D. et al., 2008). Клетки инкубировали сначала с одним фактором, затем помещали на 36 часов в среду культивирования без рекомбинантных белков и вальпроевой кислоты, и только после этого подвергали аналогичному воздействию другого фактора плюрипотентности. Цикл перепрограммирования повторяли по отдельности с каждым из четырех факторов плюрипотентности.

После этого обработанные данными белками клетки высевали на фидерный слой, состоящий из облученных мышинных эмбриональных фибробластов, и культивировали в условиях, принятых для ЭСК. Через 30-35 суток появились первые колонии, положительные по маркеру GFP, по внешнему виду ничем не отличавшиеся от колоний обычных мышинных ЭСК. Клетки в течение более 30 пассажей сохраняли свою морфологию и стабильно пролиферировали.

Иммуноцитохимический анализ показал, что GFP–положительные клетки экспрессируют маркеры плюрипотентности, такие как ALP, *Oct4*, *Nanog*, *Sox2* и *SSEA1*. Промоторы генов *Nanog* и *Oct4* в полученных клетках были деметилированы, как и в ЭСК, в то время как в дифференцированных клетках промоторы данных генов находятся в гиперметилированном состоянии, обеспечивая блокирование экспрессии эмбриональных генов. Таким образом, доказано, что в iPS-клетках происходит реактивация экспрессии характерных для ЭСК факторов.

Сравнение экспрессии геномов iPS-клеток, ЭСК и эмбриональных фибробластов также продемонстрировало, что экспрессия генома iPS-клеток практически не отличается от экспрессии генома ЭСК, не совпадая при этом с экспрессией генома эмбриональных фибробластов.

В суспензии iPS-клетки, как и ЭСК, образовывали эмбриоидные тельца, в которых шла спонтанная разнонаправленная дифференцировка клеток в производные трех зародышевых листков. Более того, при трансплантации в бластоцисту мыши iPS-клетки включались в состав внутренней клеточной

массы, дифференцируясь затем в клетки самых разных тканей зародыша, в том числе давая начало первичным половым клеткам.

Таким образом, в работе приведены доказательства того, что новый метод индукции плюрипотентности у соматических клеток без внесения чужеродного генетического материала позволяет получить плюрипотентные клетки, по свойствам *in vitro* и *in vivo* не отличающиеся от ЭСК. Авторы работы не проверяли стабильность генома и туморогенность дифференцированных производных полученных iPS-клеток, поэтому нельзя сделать окончательного заключения о перспективе применения iPS-клеток человека, полученных аналогичным методом, в клинике для целей клеточной терапии (Григорян А.С., 2009б).

1.7.6. iPS-клетки человека, полученные с помощью плазмидного вектора на основе ядерного антигена-1 вируса Эпштейн-Барр (oriP/EBNA1)

Индукция плюрипотентности как у мышиных, так и у человеческих соматических клеток была впервые достигнута интеграцией в их геном комбинаций факторов Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4, Nanog и Lin8 (Takahashi K. et al., 2006, 2007; Yu J. et al., 2007). В первых разработанных методиках перепрограммирования применялись вирусные векторы, встраивающиеся в ДНК клетки-реципиента. Такие векторы могут провоцировать инсерционные мутации, которые нарушают нормальные функции клеток, влияют на дифференцировку в определенных направлениях (Yu J. et al., 2007), в некоторых случаях приводят к канцерогенезу (Okita K. et al., 2007). Существуют экспериментальные работы на клетках животных по получению iPS-клеток с помощью аденовирусных векторов, не интегрирующихся в геном, и плазмид (Stadtfeld M. et al., 2008; Okita K. et al., 2008), но эффективность этих методов крайне мала (Takahashi K. et al., 2007; Yu J. et al., 2007).

Появились сообщения о получении iPS-клеток мыши и человека с последующим удалением из них трансгена. В одном из подходов была применена Cre/LoxP рекомбинация (Kaji K. et al., 2009). Однако рекомбиназа Cre, вырезая из ДНК клетки трансген, оставляет в ней часть вектора, что также нежелательно.

Во втором случае в качестве носителя генов плюрипотентности использовался транспозон PiggyBac, затем, схожим образом, удалявшийся из дифференцированного потомства iPS-клеток (Woltjen K. et al., 2009). Несмотря на то, что этот подход весьма многообещающий, удаление из клеток большого числа копий транспозона, встраивающихся в геном, довольно сложная задача, вряд ли совместимая с клиническими нуждами.

J. Yu et al. (2009) описали метод получения iPS-клеток человека без применения интегрирующихся в геном векторов. Авторам удалось создать плюрипотентные клетки со всеми характеристиками ЭСК из дифференцированных фибробластов кожи человека с помощью единичной

трансфекции плазмидным вектором на основе ядерного антигена-1 вируса Эпштейн-Барр (oriP/EBNA1), удобным для внесения в соматические клетки человека факторов перепрограммирования, а также способным спонтанно удаляться из клеток в отсутствие селекции на антибиотиках. Не встраиваясь в хромосомную ДНК клеток, вектор реплицируется, проходя один цикл репликации за один клеточный цикл. Стабильной экспрессии этого эписомного вектора удается добиться в 1% изначально трансфицированных клеток. Помимо этого, авторам работы удалось повысить эффективность перепрограммирования клеток с помощью данного вектора примерно в десять раз, встроив в него последовательность IRES2 (internal ribosome entry site 2), которая служила линкерной областью между генами плюрипотентности, вносимыми с помощью вектора в клетки (Григорян А.С., 2009а).

Путем перебора возможных вариантов трансфекции, исследователи остановились на генах *Oct4* и *Sox2*, которые, будучи внесенными в составе эписомного вектора в фибробласты кожи, обеспечивали их возвращение в плюрипотентное состояние. iPS-клетки демонстрировали типичную для ЭСК человека морфологию (например, компактные колонии, небольшое количество цитоплазмы и крупное ядро, четко определяющиеся ядрышки), а также экспрессию генома, характерную для ЭСК, что было показано с помощью ПЦР-анализа. При введении в организм мышей с иммунодефицитом эти клетки образовывали тератомы, состоящие из дифференцированных производных трех зародышевых листков. Анализ с помощью ПЦР не выявил присутствия трансгена в хромосомной ДНК клетки, но показал его в эписомной фракции. По-видимому, для успешного перепрограммирования требуется продолжительное присутствие трансгенной эписомы в клетках.

Затем авторы работы отобрали несколько iPS-клонов, которые в процессе пролиферации спонтанно потеряли эписомный вектор oriP/EBNA1, и подвергли их субклонированию. У субклонов вектор с трансгеном отсутствовал как в хромосомной ДНК, так и в эписомной фракции, что было подтверждено Саузерн-блот-гибридизацией. Морфологически субклоны не отличались от ЭСК, имели нормальный кариотип, экспрессировали специфические для ЭСК маркерные гены (*Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Lin28*) и соответствующие белки. Также они эффективно дифференцировались в производные трех зародышевых листков. Промоторы генов *Oct4* и *Nanog* в этих клетках были деметилированы, как в нормальных ЭСК, в отличие от дифференцированных клеток. В течение 7 месяцев культивирования клетки продолжали делиться, не теряя своих свойств и не демонстрируя признаков репликативного старения. Эффективность перепрограммирования и последующего получения клеток со стабильно экспрессирующимся вектором очень низкая – из 10^6 фибробластов можно получить лишь 3-6 колоний iPS-клеток. Тем не менее, этого достаточно для наработки больших количеств

плюрипотентных клеток, к тому же, сами фибробласты легко выделить и культивировать *in vitro* (Григорян А.С., 2009а).

1.7.7. Влияние неспецифических ингибиторов ДНК-метилтрансферазы и гистоновой деацетилазы на эффективность репрограммирования эмбриональных фибробластов мышей

Эктопическая экспрессия факторов транскрипции Oct4, Klf4, Sox2 и *c-Myc* репрограммирует мышечные эмбриональные фибробласты (МЭФ) и человеческие фибробласты в ЭСК-подобные клетки (Maherali N. et al., 2007; Okita K. et al., 2007; Takahasyi K. et al., 2007; Park I.H. et al., 2008), что позволяет предположить универсальность механизмов репрограммирования клеток. Однако, репрограммирование с применением ретровирусов оказалось медленным и малоэффективным процессом. Генетическая трансформация с помощью экзогенных генов, в особенности, онкогенов, таких как *c-Myc* и *Klf4* и использование ретровирусной системы доставки значительно осложняют будущее терапевтическое применение этого метода. Поэтому необходима разработка новых протоколов получения индивидуальных линий репрограммированных клеток, достаточно эффективных и потенциально подходящих для использования в клинике.

Преыдушие исследования показали, что ингибитор гистоновой деацетилазы (histone deacetylase – HDAC) и деметилирование ДНК оказывают положительное влияние на эффективность репрограммирования при переносе ядра соматической клетки (Blelloch R et al., 2006). Этот факт натолкнул исследователей на мысль о том, что неспецифические эпигенетические регуляторы могут увеличить эффективность получения iPS-клеток. Ингибиторы ДНК-метилтрансферазы и гистоновой деацетилазы повышают эффективность репрограммирования в десятки и сотни раз на примере трансгенных Oct4-GFP МЭФ (Мелихова В.С., 2008а).

Используя трансген Oct4-GFP исследователи проверили как выбранные небольшие молекулы влияют на модификацию хроматина и репрограммирование. Эктопическая экспрессия четырех факторов транскрипции (Oct4, Sox2, Klf4 и *c-Myc*) в трансгенных МЭФ Oct4-GFP индуцировала экспрессию GFP у $0,03 \pm 0,02\%$ клеток (на 7-е сутки после введения векторов). Процент GFP+ клеток оставался одинаковым вплоть до 13-х суток. Инкубация трансфицированных МЭФ с 5-азацитидином, ингибитором ДНК-метилтрансферазы, увеличивала количество GFP⁽⁺⁾-клеток примерно в 10 раз (до $0,50 \pm 0,06\%$). При этом действие этого агента было дозозависимым. Дексаметазон, синтетический глюкокортикоид, увеличивал воздействие 5-азацитидина в 2,6 раза (только при использовании в сочетании с 5-азацитидином).

Три известных ингибитора HDAC, субероиланилид гидроксамовой кислоты (SANA), трихостатин А (TSA) и вальпроевая кислота (VPA) также

значительно увеличивали эффективность репрограммирования. При этом действие VPA было наибольшим. Так воздействие на МЭФ VPA в течение 1 недели позволило добиться получения $11,8 \pm 2,2\%$ GFP⁽⁺⁾-клеток, что в 4100 раз превышает контрольные показатели. Вещество также проявляет дозозависимый эффект. Возможно, что такая значительная разница в эффективности исследованных препаратов объясняется тем, что все они (кроме VPA) являются токсичными уже в небольших концентрациях.

Проанализирована способность клеток, подвергнутых воздействию 5-азацитидина и VPA, к формированию колоний iPS-клеток при трансфекции тремя факторами (Oct4, Sox2 и Klf4) (Nakagawa M. et al., 2008). Oct4-GFP МЭФ были инфицированы Oct4, Sox2 и Klf4, а затем подвергнуты воздействию 5-азацитидина и VPA в течение одной недели. Через 10 суток FACS-анализ зафиксировал увеличение количества GFP⁽⁺⁾-клеток в 3 раза по сравнению с данными через 3 суток после трансфекции. Воздействие VPA увеличивало эффективность репрограммирования в 50 раз. Это позволило отобрать колонии iPS-клеток уже через 2 недели после трансфекции. Полученные клетки имели типичную для ЭСК морфологию, позитивно окрашивались на щелочную фосфатазу и экспрессировали маркеры плюрипотентности. Исследование паттерна генной экспрессии таких клеток показало, что полученные iPS-клетки значительно отличаются от МЭФ и больше всего напоминают мышинные ЭСК. Детальный анализ генной экспрессии показал, что действие VPA вызывает активацию ЭСК-специфических генов и ингибирование экспрессии генов МЭФ (Мелихова В.С., 2008а).

Таким образом, доказано, что неспецифические химические агенты, вызывающие эпигенетические изменения, положительно влияют на эффективность репрограммирования и могут заменить один или более факторов транскрипции (Мелихова В.С., 2008а).

Вместе с тем, остается открытым вопрос об эпигенетических модификациях хроматина в других локусах генома, не связанных с поддержанием плюрипотентного статуса клеток, при воздействии хроматин-ремоделирующих агентов. Так в экспериментах на культурах эмбриональных фибробластов медицинских абортусов в сроке 9-10 недель беременности при воздействии 5-аза-2-дезоксцитидином в течение 72 часов зарегистрировано гипометилирование регуляторного центра импринтинга KCNQ1OT1 на хромосоме 11 материнского происхождения во всех 17 обследованных культурах. При этом статус метилирования двух других изученных центров импринтинга на хромосомах 11 и 15 (*IGF2/H19* и *SNURF-SNRPN*, соответственно) оставался нормальным (Sazhenova E.A. et al., 2008). Центр импринтинга KCNQ1OT1 локализован в 10-м интроне гена *KCNQ1* (11p15.5) и экспрессируется исключительно с хромосомы отцовского происхождения. На материнском гомологе данный локус находится в метилированном состоянии. Продукт транскрипции – нетранслируемая РНК выключает активность рядом расположенного кластера импринтированных генов.

Гипометилирование *KCNQ1OT1* на материнском гомологе приводит к потере импринтинга и, как следствие, к полной супрессии активности контролируемых импринтированных генов, среди которых имеется опухолесупрессорный ген *CDKN1C*, ответственный за негативную регуляцию клеточного цикла. Такая последовательность событий развивается в патогенезе примерно 50% случаев синдрома Беквита-Видеманна, одного из классических примеров болезней геномного импринтинга (Choufani S. et al., 2010), а также регистрируется при широком спектре онкологической патологии.

Очевидно, что нарушения эпигенетического статуса импринтированных генов могут быть одной из причин низкой эффективности процедур репрограммирования генома дифференцированных соматических клеток. Кроме того, они заслуживают пристального внимания и в плане мониторинга биобезопасности используемых клеточных технологий.

1.7.8. Технология репрограммирования ядра взрослой клетки без использования эмбрионов «Stembrid»

Технология переноса ядра соматической клетки (SCNT) является основным способом получения линий аутогенных стволовых клеток, специфичных только для конкретного пациента (Jeanisch R. et al., 2002; Hwang W.S. et al., 2005). Кроме того, SCNT служит моделью изучения феномена репрограммирования ядра взрослой клетки. До недавнего времени считалось, что у человека лишь овоплазма яйцеклетки обладает уникальной способностью репрограммировать ядро взрослой клетки (Jeanisch R. et al., 2002). Однако в недавних работах показано, что и ЭСК как мыши (Tada M. et al., 2001), так и человека (Cowan C.A. et al., 2005; Yu J. et al., 2006) также способна репрограммировать ядро взрослой клетки при их слиянии. Тем не менее, получаемые при этом тетраплоидные гибриды, содержащие ядра обеих клеток, вряд ли смогут применяться с медицинской целью, поскольку неизвестна их безопасность (Cowan C.A. et al., 2005).

История создания клеточных гибридов насчитывает около 40 лет. В 1974 году впервые выполнена «реконструкция» (технология «reson») клеток млекопитающих путём слияния цито- и кариопластов. Позднее была предложена технология цитоплазматических гибридов – «cybrid», когда родительскую клетку перед слиянием энуклеировали. При слиянии ядра злокачественной клетки и нормальной клетки, «цибрид» терял свойства онкогенности. При слиянии унипотентной эмбриональной карциномы F9 с клетками тимуса и роговицы получали плюрипотентные гибридные линии, имеющие характеристики зрелых нервной, мышечной и хрящевой тканей.

Технологию «cybrid» использовали для получения аутогенных стволовых клеток путем слияния взрослой клетки с энуклеированной ЭСК. Для слияния использовали цитопласты нормальных ЭСК и фибробласты, лимфоциты периферической крови и мононуклеарные клетки пуповинной

крови человека. На полученных колониях изучали экспрессию маркёров плюрипотентности ЭСК – TRA-2-39 и Oct-4.

Частота слияния зависела от вида клеток и режима процедуры. Оптимизация концентрации таких агентов слияния как ДМСО и полиэтиленгликоль приводила к частоте формирования гетерокарионов в 12,8% с фибробластами и в 18,4% с лимфоцитами. Поскольку в эксперименте использовали «женские» (46,XX) ЭСК и «мужские» (46,XY) соматические клетки, то формирование стабильных гетерокарионов подтверждали RSH-анализом на Y-хромосому. Клетки *cybrid*-колоний митотически делились, имели типичную морфологию ЭСК, характеризовались стабильным кариотипом 46,XY и высоким уровнем экспрессии TRA-2-39 и Oct-4. Кроме того, клетки колоний экспрессировали и другие маркеры плюрипотентности ЭСК – SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 и TRA-1-80.

Таким образом, представлены доказательства полной замены ядра ЭСК ядром соматической зрелой клетки при их слиянии. Получены первичные данные, что цитоплазма ЭСК способна репрограммировать ядро взрослой клетки человека при его замене. В аналогичном эксперименте с клетками мыши, получена только одна колония с экспрессией Oct-4 (Do J.T. et al., 2004). В недавней работе японских авторов показано, что слияние кардиомиоцитов мыши с ЭСК приводит к формированию гибридов с характеристиками обеих клеток (Takei S. et al., 2005). Выделение отдельных чистых «*stembrid*» линий, наряду с *in vivo* экспериментами, могло бы стать чётким доказательством жизнеспособности и перспективности разработанной технологии (Берсенев А.В., 2006а).

1.7.9. Перепрограммирование соматических клеток человека с помощью овоцитов человека

Овоцит – клетка взрослого организма, с помощью которой возможно вернуть ядро терминально дифференцированной соматической клетки к тотипотентному состоянию (Cibelli J. et al., 2002). Перенос ядра соматической клетки в яйцеклетку вызывает процесс перепрограммирования, которое включает в себя цепь молекулярных событий, согласованно происходящих в клетке за короткий период времени. Результатом этих событий является полное изменение паттерна экспрессии генома донорского ядра и возвращение его в состояние ядра оплодотворенной яйцеклетки, которая способна дать начало всему эмбриону (Григорян А.С., 2009г).

Проведено множество исследований, в которых показана возможность межвидового перепрограммирования, то есть переноса ядра дифференцированной клетки, полученной от организма одного вида, в овоцит организма другого вида, вслед за чем следовало возвращение донорскому ядру свойства тотипотентности и развития гибридного эмбриона до доимплантационной стадии (Tecirlioglu R.T. et al., 2006; Beyhan Z. et al., 2007). При этом, чем более близко родство этих видов, тем больше делений

способна претерпеть гибридная яйцеклетка (Meirelles F.V. et al., 2001; Li Y. et al., 2006). Этот феномен послужил основой мнения, что овоциты животных возможно использовать для получения аутогенных ЭСК из соматических клеток человека. Такие гибридные ЭСК могли бы стать основой клеточной терапии самых разных заболеваний, являясь альтернативой индуцированным плюрипотентным клеткам (iPS-клеткам), для получения которых требуется вирусная трансфекция соматических клеток, и настоящим ЭСК, в случае которых невозможно получить аутогенный материал. Получение аутогенных ЭСК путем терапевтического клонирования с помощью овоцитов животных могло бы также помочь избежать этических сложностей, вызываемых использованием яйцеклеток человека (Григорян А.С., 2009г).

В то же время, на сегодняшний день не существует никаких экспериментальных подтверждений того, что с помощью межвидового переноса ядра соматической клетки (iSCNT, от interspecies somatic cell nuclear transfer) можно получить стволовые клетки человека. Неясно также, можно ли в принципе соотносить перепрограммирование ядра соматической клетки человека в цитоплазме человеческой яйцеклетки и яйцеклетки животного. В одной работе было показано, что при переносе ядра из дифференцированной клетки человека в овоцит кролика можно получить жизнеспособные стволовые клетки, идентичные эмбриональным (Chen Y. et al., 2003), но эти результаты не удалось повторить в других лабораториях (Jingjuan J. et al., 2005; Vogel G., 2006). В дополнение к этому, существуют свидетельства, что паттерны метилирования и деметилирования геномной ДНК строго видоспецифичны (Chen T. et al., 2006), а это значит, что в цитоплазме овоцита животного, даже стоящего близко к человеку по эволюционной лестнице, ДНК человека не подвергнется всем необходимым эпигенетическим модификациям, и полученная гибридная клетка никогда не даст начало человеческим ЭСК.

С помощью микрочиповой технологии (microarray) и тотального скрининга ДНК показано, в какой мере происходит перепрограммирование генома соматической клетки человека при переносе ее ядра в овоциты человека, кролика, коровы и мыши. Донорами ядер послужили клетки кумулюса – фолликулярные эпителиоциты. В качестве контроля в этой работе использованы клетки из бластоцист человека, полученных путем экстракорпорального оплодотворения, а также клетки кумулюса.

После переноса ядра и активации эмбрионы культивировали, а затем проводили генотипирование образовавшихся из них бластомеров. Эмбрионы, полученные путем переноса ядра в овоцит человека, генотипировали на стадии морулы. При переносе ядра в овоцит животных генотипирование проводили на разных стадиях: от стадии восьми клеток до стадии морулы. Эта разница связана с тем, что эмбрионы, полученные при межвидовом переносе ядра, менее жизнеспособны, нежели при внутривидовом переносе, и развиваются в зависимости от вида донора овоцита до разных стадий. Так, при переносе ядра человеческой клетки в женский овоцит

шестнадцатиклеточный зародыш развивается в 39% случаев, в овоцит коровы либо кролика – в 36% случаев, а в овоцит мыши – никогда, и лишь 46% зародышей достигало двухклеточной стадии. По этой причине клоны на основе мышинных яйцеклеток в сравнительном анализе не учитывали. Помимо тотального скрининга генома авторы провели анализ единичных нуклеотидных полиморфизмов (SNP-анализ), анализ митохондриальной ДНК бластомеров и кариотипирование.

Анализ геномной ДНК показал существенные различия паттернов генетической экспрессии между соматическими клетками, нормальными эмбрионами и эмбрионами, полученными путем терапевтического клонирования. Разница между экспрессией генома соматической клетки человека и бластомеров, развившихся после внутривидового переноса ядра, заключалась в различной экспрессии 6178 генов. При этом активность 5200 из них была в сравнении с соматической клеткой подавлена, а остальных, наоборот, сильно повышена. Экспрессия генов-маркеров плюрипотентности Oct-4, Sox-2 и Nanog (Yu J. et al., 2007) была также повышена в клонах и в нормальных эмбрионах человека, полученных путем экстракорпорального оплодотворения. Подавлялась экспрессия тканеспецифических генов (для клеток кумулюса такими генами являются гены рецептора фолликулостимулирующего гормона FSHR, гиалуронан-синтазы-2 has2 и белка STAR). Таким образом, внутривидовой перенос ядра дифференцированной клетки в овоцит радикальным образом изменяет экспрессионный паттерн геномной ДНК. Клоны, полученные путем внутривидового переноса ядра, имеют нормальный диплоидный набор хромосом.

Иным образом обстояло дело при межвидовом переносе ядер. При переносе ядра в овоцит кролика только 73% эмбрионов сохраняло нормальный диплоидный кариотип, при переносе ядра в овоцит коровы эта цифра составила 67%, а в овоцит мыши – 60%. В сравнении с клетками кумулюса человека в гибридных эмбрионах, полученных с помощью овоцитов коровы, 4629 генов имели иной паттерн экспрессии, овоцитов кролика – 3008 генов. Экспрессия 70% из этих генов была в обоих случаях подавлена. В сравнении с нормальными эмбрионами человека в клонах из коровьих эмбрионов 2950 генов имели иную экспрессию, из кроличьих – 2379.

Таким образом, несмотря на то, что факторы, содержащиеся в цитоплазме яйцеклеток животных, были способны поддерживать жизнеспособность эмбриона в течение ограниченного времени, частично перепрограммируя ядро соматической клетки человека, специфического перепрограммирования и получения нормальных ЭСК не наблюдалось ни в одном случае. Только эмбриональные стволовые клетки, полученные на основе яйцеклеток человека, имели паттерн экспрессии генов, практически неотличимый от паттерна экспрессии генома нормальных человеческих эмбриональных стволовых клеток. Анализ митохондриальной ДНК клеток

клонированных эмбрионов также показал, что при межвидовом переносе ядра в образующихся бластомерах присутствуют митохондрии как с ДНК человека, так и вида – донора овоцита.

Авторы работы делают вывод, что для получения человеческих ЭСК не подходят именно яйцеклетки коровы, кролика и мыши, однако из результата их работы можно сделать и более общее предположение – по-видимому, межвидовой перенос ядер в принципе не может обеспечить получения нормальных, аутогенных для данного человека эмбриональных стволовых клеток (Григорян А.С., 2009г).

Процесс перепрограммирования соматических клеток в плюрипотентные *in vitro* является достаточно сложным для изучения. Наиболее проблематично оценить количественные характеристики и временные рамки происходящих критических событий. Причиной этого является клеточная и генетическая гетерогенность полученных *de novo* трансформированных соматических клеток. Для того, чтобы обойти необходимость вирусной трансдукции и уменьшить гетерогенность экспрессии перепрограммирующих факторов, была изобретена «вторичная» перепрограммирующая трансгенная система, в которой все соматические клетки обладают одинаковым паттерном интеграции препарат-индуцируемых вирусных трансгенов Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc (Hanna J. et al., 2008; Wernig M. et al., 2008; Markoulaki S. et al., 2009).

Используя эту систему на клетках линии В-лимфоцитов Nanog-GFP репортерных мышей, предпринимались попытки решить ряд актуальных вопросов эпигенетики:

- как происходит развитие процесса перепрограммирования генетической системы клеток в течение времени и что происходит с преобладающим количеством клеток, которые не становятся перепрограммированными в течение продолжительных клеточных делений на фоне экспрессии перепрограммирующих факторов;

- за счет чего некоторые соматические клетки, обошедшие механизмы клеточного старения и апоптоза в результате экспрессии Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc превращаются в индуцированные плюрипотентные стволовые (iPS) клетки раньше других;

- все ли взрослые донорские клетки, экспрессирующие факторы Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc, в конечном счете, станут iPS-клетками, или это может быть достигнуто за счет дополнительных генетических или молекулярных манипуляций;

- ограничена ли высокая перепрограммирующая способность только для клеток, не принадлежащих к каким-либо линиям дифференцировки, и взрослым стволовым клеткам (Иванов А.В., 2010).

Авторы исследовали характеристики процесса перепрограммирования путем изменения генетической программы клеток. Было использовано индуцированное выключение ряда генов с помощью метода коротких интерферирующих РНК. В ходе экспериментов проводился постоянный

контроль экспрессии факторов *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*. Генами-мишенями для выключения были выбраны *p53* и *p21*. Белок *p21*, который является основной эффекторной мишенью *p53*, регулирует прогрессию клеточного цикла и является ингибитором циклин-зависимых киназ. Также было оценено влияние сверхэкспрессии гена *Lin28*, усиливающего перепрограммирование фибробластов человека и действующего как онкоген, модулирующий экспрессию регуляторов клеточного цикла.

В результате оказалось, что совместное выключение (нокдаун) обоих генов *p53* и *p21*, или сверхэкспрессия *Lin28* ускоряют процесс перепрограммирования. В случае *p53/p21*-ингибирования задействован механизм, зависимый от уровня пролиферации клеток. Механизм действия белка *Lin28* несколько иной – акселерация появления iPS-клеток проявляется за счет более быстрого увеличения клеточной популяции в результате сокращения времени клеточного цикла и ускоренного деления клеток.

Следующим шагом стало исследование влияния на перепрограммирование клеток гена *Nanog*, являющегося фактором плюрипотентности и экспрессирующегося во время эмбрионального развития в клетках внутренней клеточной массы. Эмбриональные стволовые клетки и iPS-клетки нуждаются в присутствии функционального эндогенного аллеля *Nanog* (Silva J. et al., 2009).

Установлено, что усредненное число клеточных делений до появления iPS-клеток существенно снизилось с 70 (у контроля и линий с выключенными генами *p53* и *p21*) до 50 делений (у линии с сверхэкспрессией *Nanog*). Такие данные позволяют сделать вывод о том, что сверхэкспрессия *Nanog* ускоряет кинетику перепрограммирования за счет внутриклеточных механизмов, независимых от уровня клеточной пролиферации. Дальнейшее изучение молекулярного механизма, за счет которого белок *Nanog* управляет системой поддержания плюрипотентности клеток, представляет несомненный интерес (Иванов А.В., 2010).

Следует отметить, что число клеточных делений, необходимых для получения iPS-клеток, не является ключевым параметром при использовании других стратегий перепрограммирования. В случае переноса ядра соматической клетки в яйцеклетку ген *Oct4*, являющийся маркером плюрипотентности и молчащий в соматическом ядре, реактивируется в течение 1-2 клеточных делений (Boiani M. et al., 2005; Egli D. et al., 2007). Это свидетельствует о том, что в цитоплазме яйцеклетки содержатся пока неизвестные детерминанты, посредством которых стойкое перепрограммирование достигается за единичные клеточные циклы (Egli D. et al., 2008).

В результате исследований оказалось возможным сделать следующие выводы:

– перепрограммирование соматических клеток в плюрипотентные является стохастическим процессом, при этом практически все соматические

клетки имеют возможность стать iPS-клетками при непрерывном делении на фоне экспрессии факторов Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc;

– хотя перепрограммированные клетки появляются не ранее 8-10 суток экспрессии Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc (Brambrink T. et al., 2008), время экспозиции в доксициклине (запускающем экспрессию лентивирусного вектора с факторами Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc) и число клеточных делений, прошедших до появления популяции клонов iPS-клеток, сильно варьирует;

– данные исследования не подтверждают гипотезу «элитных компонентов» для перепрограммирования клеток (Yamanaka S., 2009): большинство, если не все, клетки линии В-лимфоцитов и моноциты с устойчивой экспрессией всех четырех факторов перепрограммирования оказались способны произвести iPS-клетки;

– соматические клетки перепрограммируются с реализацией различных латентностей, что не может быть объяснено только разницей в темпе пролиферации и временем экспозиции в доксициклине. Подтверждается участие неопределенных стохастических событий, происходящих во время процесса перепрограммирования клеток (Иванов А. В., 2010).

1.7.10 Прямое репрограммирование дифференцированных соматических клеток

Репрограммирование дифференцированных соматических клеток в клетки с индуцированной плюрипотентностью, запускаемое эндогенной экспрессией ряда генов «плюрипотентности», сопровождается серьезной реорганизацией их эпигенетического статуса. Ключевым моментом такой трансформации является приобретение клетками эпигенетических характеристик, которые в значительной степени свойственны эмбриональным стволовым клеткам. По всей видимости, такое состояние обеспечивает возможность дальнейшей клеточной дифференцировки по тому или иному пути развития (Hanna J. et al., 2010). Однако, здесь возникает принципиальный вопрос, насколько обязательным является этап индукции плюрипотентности для перепрограммирования одного типа дифференцированных соматических клеток в другой. Иными словами, способна ли дифференцированная клетка «трансдифференцироваться» в другой тип, минуя возврат к плюрипотентному состоянию.

Один из первых примеров подобной трансформации клеток в пределах одного зародышевого листка был получен еще в 1989 году, когда удалось конвертировать фибробласты в мышечные клетки за счет сверхэкспрессии транскрипционного фактора MyoD (Weintraub H. et al., 1989). Однако экспрессия гена *MyoD* не была подтверждена в мышечных клетках, что оставило открытым вопрос о полноте прямого репрограммирования.

К настоящему времени накоплен ряд фактов, свидетельствующих о возможности прямого репрограммирования клеток как в пределах одного,

так и разных зародышевых листков (Hanna J. et al., 2010). Так опубликованы данные о возможности прямого репрограммирования фибробластов сердца и кожи в кардиоцит-подобные клетки за счет эктопической экспрессии трех транскрипционных факторов *Gata4*, *Mef2C* и *Tbx5* (Ieda M. et al., 2010). Репрограммированные клетки не зависели от экспрессии трансгенных конструкций и демонстрировали транскрипционные и функциональные характеристики, сходные с кардиомиоцитами, обладали способностью к спонтанному сокращению. Интересно, что эффективность репрограммирования оказалась выше, если в качестве исходных клеток использовали фибробласты кожи.

Трансдифференцировка *in vitro* была продемонстрирована и в гематопоэтической линии. Так, например, эктопическая экспрессия транскрипционного фактора *C/EBP α* конвертировала лимфоциты в макрофаго-подобные клетки (Xie H. et al., 2004).

Прямое репрограммирование клеток в пределах разных зародышевых листков также оказывается возможным. Показано, что эктопическая экспрессия транскрипционного фактора MITF (microphthalmia-associated transcriptional factor) конвертирует фибробласты в меланоцит-подобные клетки, способные синтезировать меланин (Tachibana M. et al., 1996). Однако, репрограммированные клетки частично сохраняли экспрессию «фибробласт-специфичных» генов и имели сниженную экспрессию маркеров меланоцитов. Иными словами наблюдалось неполное репрограммирование.

В недавнем исследовании с помощью набора нейрональных транскрипционных факторов удалось конвертировать фибробласты мыши в нейроно-подобные клетки (Vierbuchen T. et al., 2010). Репрограммированные клетки демонстрировали ключевые морфо-функциональные признаки зрелых нейронов, включая экспрессию кортикальных маркеров, генерацию импульсов и формирование синапсов. Однако в работе не было показано, выключалась ли в таких клетках экспрессия фибробласт-специфичных генов и поддерживали ли они свои новые характеристики исключительно за счет экспрессии трансгенов. Тем не менее, результаты этого эксперимента поставили вопрос об его воспроизводстве на культурах клеток человека и о возможности получения пациент-специфичных нейрональных клеток у индивидов с нейродегенеративными заболеваниями (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона).

В 2011 году опубликованы первые результаты исследований в этом направлении (Qiang L. et al., 2011). Первоначальная попытка трансформировать фибробласты кожи взрослых индивидов с помощью комбинации транскрипционных факторов *Ascl1*, *Brn2* и *Myt1l*, которые оказались эффективными при репрограммировании фибробластов мыши, не увенчалась успехом и вела к апоптотической гибели клеток. В дальнейшем к этому набору транскрипционных факторов были добавлены еще два регулятора – *Zic1* и *Olig2*, и в присутствии в среде нейротрофических факторов BDNF и NT3 были получены первые индуцированные

нейрональные клетки. Спустя три недели после трансформации эти клетки демонстрировали экспрессию таких нейрональных маркеров как Tuj1, MAP2, Tau1, NeuN, NCAM и Neurofilament-160 kd.

Более 90% MAP2-позитивных клеток также демонстрировали экспрессию неокортикального нейронального маркера Tbr1 и при этом не имели экспрессии фибробласт-специфического протеина FSP1. Примерно половина MAP2-позитивных клеток была позитивна и по такому нейрональному маркеру, как везикулярный транспортер глутамата (vGLUT1). В то же время, репрограммированные клетки не демонстрировали экспрессии маркера астроглии GFAP.

Разработанный протокол прямого репрограммирования был апробирован на культурах фибробластов пациентов с болезнью Альцгеймера, носителей мутаций в генах пресенилина-1 и -2 (*PSEN1*, *PSEN2*). Индуцированные нейрональные клетки с наличием мутации продемонстрировали аномальный процессинг и локализацию амилоидного белка APP. Таким образом, была создана модельная система для изучения механизмов развития заболевания на клеточном уровне. Однако, останавливаясь на практической значимости такой разработки, неизбежно встает вопрос о возможности исправления известного генетического дефекта в репрограммированных клетках с помощью методов генной инженерии.

В целом, все отмеченные эксперименты демонстрируют факт прямого репрограммирования дифференцированных клеток *in vitro* без индукции плюрипотентного состояния. Прямое репрограммирование может протекать как в пределах одного зародышевого листка, так и обеспечивать возможность трансдифференцировки (или трансдетерминации) клеток одного зародышевого листка в другой. Однако пока остаются открытыми вопросы о полноте и эффективности такого процесса, зависят ли эти показатели от степени дифференцировки исходной клетки, ее типа, происхождения и способности к репрограммированию в том или ином направлении. Немаловажным остается вопрос и о биобезопасности культур полученных клеток по сравнению с индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками.

1.7.11. Генная инженерия в лечении нейродегенеративных заболеваний

Лечение нейродегенеративных заболеваний, патогенез которых обусловлен мутациями конкретных генов, безусловно, требует вмешательства в организм больного на генном уровне. Генная терапия позволяет, как подавить, так и усилить экспрессию гена-мишени. В настоящее время для коррекции экспрессии гена-мишени существует ряд подходов (например, антисмысловые олигонуклеотиды, РНК-интерференция, аденовирусные векторы, аденоассоциированный вирус, вирусные векторы на

основе герпесвирусов – herpes simplex viruses, HSV, ретровирусы), некоторые из которых находятся в экспериментальном статусе, тогда как другие уже проходят клинические испытания (Исламов Р.Р., 2007).

Применительно к нейродегенеративным заболеваниям технология антисмысловых олигонуклеотидов имеет практическое значение при заболеваниях, вызванных мутациями конкретных генов. Так, при введении антисмысловых олигонуклеотидов, комплементарных мРНК супероксиддисмутазы SOD1, трансгенным мышам G93A, экспрессирующим фенотип бокового амиотрофического склероза, установлено значительное снижение содержания мРНК SOD1 и белка SOD1 в тканях головного и спинного мозга. Кроме того, у таких мышей наблюдалось замедленное развитие симптомов заболевания (Smith R.A. et al., 2006).

Совершенствование способов доставки молекулы siRNA (РНК-интерференция) в клетку и потенциальная возможность лабораторного синтеза siRNA, комплементарной любой известной мРНК, открывает широкие перспективы применения РНК-интерференции в лечении инфекционных, онкологических и нейродегенеративных заболеваний (например, боковой амиотрофический склероз, хорея Хантингтона, болезнь Альцгеймера). У трансгенных мышей SCA1 со спиналомозжечковой атаксией после внутримозжечковой инъекции вирусного вектора, экспрессирующего siRNA, комплементарной мутантному гену *Atxn1* (атаксин 1), значительно улучшалась координация движений и восстанавливалась цитоархитектоника мозжечка (Xia H. et al., 2004). В другом случае при скрещивании трансгенных SOD1-мышей с мышами, экспрессирующими анти-SOD1 siRNA, у полученного потомства транскрипция siRNA, комплементарной мРНК мутированного гена, предотвращала дегенерацию мотонейронов (Saito Y. et al., 2005).

Внутримышечная (Ralph G.S., 2005) или интраспинальная (Raoul C. et al., 2005) инъекция вирусного вектора, экспрессирующего siRNA (комплементарной мРНК мутированного SOD 7) трансгенным G93A-мышам отодвигала начало заболевания и значительно увеличивала время жизни G93A-мышей. В настоящее время ведётся интенсивная подготовка к клиническим испытаниям модифицированной молекулы siRNA у пожилых больных, страдающих дегенерацией жёлтого пятна сетчатки (Karagiannis T.E. et al., 2005). У приматов введение в стекловидное тело глаза siRNA (комплементарной мРНК сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF) прекращает рост сосудов из хориокапиллярной пластинки в сетчатку через разрушенную лазером мембрану Бруха (Tolentino M.J. et al., 2004).

Полученные результаты свидетельствуют, что siRNA путём интернализации попадает в аксоны мотонейронов и может селективно заблокировать экспрессию белка-мишени (Murashov A.K. et al., 2007). Для большей эффективности захвата и ретроградного транспорта siRNA может быть конъюгирована, например, с нейротрофином-3 или С-фрагментом столбнячного токсина. Далее путём инъекции в органы конъюгированная

siRNA может быть целенаправленно доставлена в перикарионы нейронов, иннервирующих эти органы, что является альтернативой векторной трансфекции нервных клеток (Kaspar V.K. et al., 2003).

Вирусная трансфекция. Одним из перспективных методов доставки генетического материала в органы и клетки-мишени являются вирусные векторы. С помощью методов генной инженерии в геном вирусов встраивают экспрессионные конструкции, несущие один или более рекомбинантных генов. Подобные конструкции состоят из промотора, рекомбинантного гена и сигнала для полиаденилирования мРНК. В настоящее время используются экспрессионные векторы, основанные на различных вирусах (Исламов Р.Р., 2007).

Аденовирусные векторы – безоболочечные вирионы, несущие двухцепочечный вирусный геном (George J.A., 2003). Аденовирусные векторы способны инфицировать широкий спектр как делящихся, так и неделящихся клеток. Вирусный геном может принять трансгенные вставки до 8 тысяч пар нуклеотидов. Существенным недостатком данной системы является нежелательное взаимодействие с иммунной и гуморальной системами организма и, как следствие, осложнения при первоначальном инфицировании и невозможность (при необходимости) повторного использования данной вирусной системы (Schagen F.H. et al., 2004).

Из-за отсутствия способности к интеграции в геном хозяина аденовирусная система позволяет добиться лишь временной экспрессии трансгенов. Несмотря на то, что аденовирусы не инфицируют ЦНС, показано, что аденовирусные векторы способны к ретроградному аксонному транспорту (Boulis N.M. et al., 2002). Эти векторы, экспрессирующие различные терапевтические нейротрофические факторы, успешно применяли на различных моделях животных (Manabe Y. et al., 2002; Miagkov A. et al., 2004).

Ещё одним перспективным вирусным вектором для генной терапии нейродегенеративных заболеваний является рекомбинантный аденоассоциированный вирус (recombinant adeno-associated virus – rAAV) (Mandel R.J. et al., 2006). Это непатогенный парвовирус человека нуждается в коинфекции хелперным вирусом для репликации (Muzyczka N. et al., 2001).

Показано, что rAAV эффективен в нервной системе и инфицирует преимущественно нейроны (Burger C. et al., 2005; McCown T.J. et al., 2005). Несмотря на то, что AAV дикого типа интегрируется в хромосому хозяина, рекомбинантный rAAV потерял данную способность и присутствует в клетке хозяина в виде эписомы. Одним из недостатков rAAV является ограничение в размере вставки трансгенной конструкции (< 5 тысяч пар нуклеотидов). Использование rAAV позволяет достичь долговременной экспрессии трансгенов. rAAV поддерживали экспрессию трансгенов в мозге крыс до 19 месяцев.

Вирусные векторы на основе герпесвирусов (herpes simplex viruses – HSV) обладают высокой инфекционностью по отношению к нервным клеткам в связи с природным тропизмом данных вирусов. Эти вирусы также

участвуют в эффективном anterо– и ретроградном транспорте в нервной системе. Модифицированные герпесвирусные векторы устанавливают эписомную репликацию в клетке хозяина и способны нести значительные трансгенные вставки (< 50 тысяч пар нуклеотидов) (Glorioso J.C. et al., 2004).

Ретровирусы способны нести до 10 тысяч пар нуклеотидов трансгенной информации и вызывают долговременную экспрессию трансгенов. Применение ретровирусов для генной терапии нейродегенеративных заболеваний рассматривается с целью доставки разных факторов роста и нейротрофических факторов в ЦНС (Ralph G.S. et al., 2006). При нейродегенерации снижается экспрессия нейротрофических факторов, поэтому считается перспективной доставка нейротрофинов с помощью вирусных векторов (например, при болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, болезни Хантингтона и боковом амиотрофическом склерозе). В эксперименте инфицирование трансгенных G93A мышей вирусным вектором, экспрессирующим VEGF (Azzouz M. et al., 2004), или IGF-1 (Kaspar В.К. et al., 2003) существенно отодвигало начало заболевания и значительно увеличивало время жизни G93A мышей. Однако, начатые клинические испытания не выявили положительного эффекта (Исламов Р.Р. и др., 2007; Zuccato C. et al., 2001; Dawbarn D. et al., 2003).

Глава 2. ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ

Под генной терапией понимают введение нуклеиновых кислот в клетку с целью воздействия на медицинский статус организма и лечения болезни. При этом ген рассматривается как новый фармацевтический препарат для лечения многих моногенных (мутации в одном гене), полигенных, мультифакториальных (мутантные гены + неблагоприятные внешние факторы), инфекционных заболеваний и патологических состояний. Гены и их ДНК-фрагменты перспективны в создании нового поколения вакцин против многих инфекционных болезней и опухолей. В связи с полной расшифровкой генома фармакология пополнилась многими генноинженерными препаратами.

Большинство одобренных для клинических испытаний проектов генной терапии выполняются в США, меньшая часть – в Западной Европе (например, во Франции, Великобритании, Италии, Германии). К сожалению, ни одного сколько-нибудь продвинутого и официально утвержденного генно-терапевтического проекта клинических испытаний в России или в странах СНГ не существует. 2/3 проектов находятся в фазе I клинических испытаний (оценка токсичности генной конструкции), остальные – между фазами I/II (ограниченные испытания на небольшом контингенте больных) и только 2 проекта, касающиеся лечения смертельной опухоли мозга – глиобластомы – в фазе III (широкомасштабные клинические испытания в нескольких центрах).

Более половины выполняемых проектов генной терапии приходится на лечение опухолей, другие – на лечение инфекционных болезней (например, СПИД, гепатит В, туберкулез), моногенных заболеваний (муковисцидоз, болезни накопления, семейная гиперхолестеринемия, гемофилия В). Остальные эксперименты касаются использования генных конструкций для клеточного маркирования *in vivo* и позволили получить информацию об иммунологических свойствах опухолевых клеток и их чувствительности к Т-лимфоцитам (Баранов В.С., Баранов А.Н., 2000).

Историю генной терапии, как нового направления медицины, делят на три этапа.

Этап I (1970-1990 годы) характеризуется попытками лечения дефицита фермента аргиназы заражением клеток вирусом папилломы Шоупа.

Начало этапа II знаменуется единственной до настоящего времени успешной попыткой лечения врожденного иммунодефицита, осуществленной в США в сентябре 1990 года. В 1992 году предприняты попытки лечения методом *ex vivo* семейной гиперхолестеринемии (мутация в гене рецептора липопротеинов низкой плотности) и гемофилии В, в 1993 году – муковисцидоза и в 1995 году – первые попытки лечения глиобластомы.

С 1997 года и по настоящее время (этап III) наметился качественный прорыв в технике доставки чужеродных генов и число генно-терапевтических вмешательств продолжает возрастать (Баранов В.С., Баранов А.Н., 2000).

2.1. Проблема векторов в генной терапии

Проблема доставки нужного гена в нужную клетку с целью получения правильной дозы необходимого белкового продукта, обладающего терапевтическим эффектом, до настоящего времени не решена и продолжает оставаться центральной проблемой проектов генной терапии.

Трудность достижения этой цели определяется тем, что организм животных и человека затратил много тысяч лет, чтоб защитить себя от чужеродной ДНК, пытавшейся проникнуть в его геном. Преодолеть эти защитные барьеры очень сложно и технология доставки генов является главным препятствием на пути успеха генной терапии.

Для решения этой проблемы в настоящее время существуют самые разные методы (физические, химические, биологические). Наиболее перспективными на сегодняшний день в проектах генной терапии являются векторы на основе вирусов и липидов (липосом). При этом в 40% проектов генной терапии используют различные варианты ретровирусов, в 20% – модифицированные аденовирусы, в 20% – липосомы, в остальных 20% проектов – аденоассоциированный вирус, вирус оспы, генное ружье и даже "голую" ДНК (Баранов В.С., Баранов А.Н., 2000).

Учитывая, что основным недостатком аденовирусов оказался выраженный иммунный ответ организма на введение аденовирусных конструкций, прогресс в этой области коснулся создания аденовирусных векторов, лишенных практически всех собственных генов аденовирусов (guttled AdV vectors) и аденовирусов с резко ослабленным антигенным паттерном, провоцирующим иммунный ответ (Stealths AdV). Удаление собственных генов аденовирусов позволило резко увеличить размеры переносимых генных конструкций, однако, и создало дополнительные сложности с наработкой и очисткой таких векторов (Stealths AdV).

В связи с тем, что ретровирусы успешно инфицируют только митотически делящиеся клетки, заметно повысился интерес к другим вирусам, таким как ленти-вирусы и особенно аденоассоциированные вирусы, которые хорошо проникают и в неделящиеся клетки. Большое внимание в последние годы уделяется разработке комбинированных векторов с адресной доставкой, совмещающих преимущества вирусных и невирусных носителей. В частности, особенно активно изучаются комбинации аденовирус + полилизин + белок (асиалогликопротеин для рецепторов клеток печени, трансферрин (для мышечных фибрилл), Fab-полилизин (для эпителия бронхов, кишечника). Весьма перспективным представляется использование отдельных пептидов оболочки, контролирующих процесс проникновения в

клетку и интернализацию в ядро. Некоторые вирусные олигопептиды использованы в экспериментах по генной терапии миодистрофии Дюшенна.

В качестве перспективных векторов на сегодняшний день рассматриваются синтетические полимеры типа полиэтиленоксид-полиэтилен, а так же биологические полимеры типа декстрана, желатина, образующие при определенных условиях упаковки микросферы, называемые так же полимеросомы. Размеры таких микросфер можно регулировать в зависимости от условий упаковки. Кроме того, их неограниченные возможности в отношении размеров плазмидной ДНК, растворимость в живых тканях (биodeградируемость) и выраженная способность к проникновению в цитоплазму и ядра клеток привлекают к полимеросомам все больше специалистов по генной терапии. Один из вариантов таких полимеросом оказался особенно перспективным для генотерапии миодистрофии Дюшенна. Другой биологический полимер ателоколлаген с успехом применен в создании депо для экспрессирующихся генных конструкций в скелетных мышцах (Баранов В.С., Баранов А.Н., 2000).

2.2. Коррекция генных дефектов

В последние десятилетия предложен ряд принципиально новых вариантов генной терапии. При этом основное внимание обращено не на доставку нормального гена в клетки-мишени, а на коррекцию повреждений ДНК в самих клетках. Согласно одному из них, исправление точечных мутаций достигается *in vitro* путем высокоэффективной генной конверсии. Известно, что при добавлении в культуру делящихся клеток фрагментов геномной ДНК с частотой 1 на 1000 возможна гомологичная рекомбинация между нативной геномной ДНК и гомологичным ей фрагментом.

Согласно новой технологии, получившей название химеропластика, в культуру клеток добавляют небольшие по размерам синтетические ДНК/РНК гибридные молекулы (химеропласты), состоящие из короткой (25 нуклеотидов) цепочки ДНК и комплементарной ей цепочки нуклеотидов РНК. При этом в последовательность ДНК/РНК шпилечной структуры включают нужное основание, по которому планируется замена. Обе нуклеотидные последовательности шпилечной структуры комплементарны фрагменту двухцепочечной геномной ДНК, несущей мутацию. Высокая концентрация олигонуклеотидов в ядре и наличие бактериального RecA белка позволяет на несколько порядков повысить частоту гомологичной рекомбинации.

По некоторым данным, успешная конверсия (замещение нужного кодона в геномной ДНК) происходит в 25-40% клеток. Примененный *ex vivo* метод позволяет высокоэффективно осуществлять коррекцию генных дефектов. Клетки-мишени с восстановленной структурой генома могут быть возвращены в организм больного. Предполагается, что метод

химеропластики может найти применение для генной терапии не менее 2000 различных наследственных заболеваний.

Концептуально близок к химеропластике и второй подход генной терапии, направленный на коррекцию последовательности самого гена. Для многих генов показано, что отсутствие целого экзона менее катастрофично для функции белка, чем сайты мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания либо резко нарушающие конформацию белкового продукта, например, нонсенс мутации (возникновение стоп-кодона) при миодистрофии Дюшенна или delF508 в гене *CFTR* при муковисцидозе. Суть метода, получившего название *exon-skipping* (перепрыгивание, выбрасывание экзона) сводится к введению в культуру мутантных клеток *in vitro* коротких антисмысловых последовательностей РНК, комплементарных местам сплайсинга первичного РНК-транскрипта. Их гибридизация в ядре приводит к проскальзыванию петли сплайсинга с захватом и выбрасыванием из мРНК экзона, несущего мутацию. Такой подход был с успехом применен для выбрасывания экзона 23 с мутацией типа стоп-кодон у мышей *mdx* – биологических моделях миодистрофии Дюшенна.

Естественно, что оба метода (химеропластика и *exon-skipping*) могут быть применены только для коррекции генома мутантных клеток вне организма. Последние, в случае успешной трансформации, могут быть пересажены пациенту обратно. Данный подход получил названия *ex vivo* и уже нашел применение в клинических проектах по генной терапии. Удельный вес проектов генной терапии с применением метода *ex vivo* составляет около 10%. Основная часть проектов по генной терапии использует непосредственное введение генноинженерных конструкций в ткань опухоли (25%), внутривенно (15%) и подкожно (15%). Другие способы доставки генов включают интратрахеальный, внутримышечный, внутриназальный. Некоторые из этих подходов были применены в экспериментах по генной терапии миодистрофии Дюшенна (Баранов В.С., Баранов А.Н., 2000).

2.3. Генная терапия мультифакторных заболеваний

Наряду с моногенными заболеваниями, где в основе терапевтического эффекта лежит доставка в клетки-мишени неповрежденной экспрессирующей генной конструкции, все более широкое внимание привлекают подходы генной терапии к лечению мультифакторных заболеваний, патогенетическую основу которых составляют множество разных генов, повреждения которых реализуются в определенных неблагоприятных внешних условиях. Именно при таком варианте генной терапии гены выступают как лекарственные препараты, обеспечивающие симптоматическое лечение.

В значительной мере сказанное относится к опухолям, подавляющее большинство которых относится к мультифакторным заболеваниям. При

лечении многих опухолей все чаще используют целый набор различных экспрессирующихся генноинженерных конструкций, продукты которых воздействуют на разные факторы и механизмы прогрессии опухоли. Так, для лечения рака простаты широко применяют стратегию замены генов-супрессоров опухолей *TP53*, *H-RAS*, *RBI*, *P21*, антисмысловые олигонуклеотиды к гену *BCL2* (для блока антиапоптозных генов), традиционные гены-самоубийцы (вирусная тимидинкиназа или цитозиндезаминаза), ген мембранного белка е-кадгерина, который обычно утрачивается при прогрессии опухоли, а также гены, корректирующие чувствительность опухолевых клеток к андрогенам. Хорошие перспективы в онкологии имеют, по-видимому, исследования в области апоптоза трансформированных клеток и тканей с использованием пептидов, содержащих RGD-мотив, индуцирующий апоптоз.

Значительный прогресс в последнее время достигнут в лечении нейродегенеративных заболеваний, таких как боковой амиотрофический склероз, болезнь Паркинсона и хорея Гентингтона. Смысл геннотерапевтического вмешательства, проходящего клинические испытания, заключается во вживлении в определенные подкорковые отделы мозга при помощи стереотаксического аппарата полупроницаемых пластмассовых капсул, содержащих культуры клеток, продуцирующих целый набор белков, препятствующих дегенерации нервных клеток, таких как ген цилиарного нервно-трофического фактора (hCNTF), нейротрофические гены *MNTF-BDNF*, *NT-3*, *mNT 4/5*; антиоксидантные гены – *SOD-2*, *CP-2*; антиапоптозные гены – *BCL2*, *BCLK*. При необходимости в эти же экспрессирующиеся конструкции включается и ген тимидин-киназы вируса герпеса, позволяющий ликвидировать инкапсулированные клетки-продуценты с помощью ганциклавира (Баранов В.С., Баранов А.Н., 2000).

Весьма обнадеживающие результаты получены на лабораторных кроликах по лечению ревматоидного артрита. Более 30 миллионов американцев страдают от этого тяжелого заболевания. Известно, что решающая роль в воспалении суставов и их последующей деформации принадлежит различным цитокинам и другим воспалительным клеточным факторам. Для генной терапии ревматоидного артрита предполагается использовать TGF, IGF и BMP-2. Самым перспективным, как показали эксперименты на кроликах, является ген *IL-1Ra*, отвечающий за синтез белка-антагониста рецептора интерлейкина IL-1.

Существенный прогресс достигнут в экспериментах по профилактике тромбообразования путем введения в клетки эндотелия сосудов гена тканевого активатора плазминогена (фактора V свертывания крови) и по профилактике рестеноза артерий после трансплантации (шунтирования) коронарных сосудов введением гена *MuLv*, препятствующего пролиферации гладкомышечных клеток интимы сосудов (Баранов В.С., Баранов А.Н., 2000).

2.4. Генная терапия немелкоклеточного рака легких

Рак легких – одна из ведущих причин смертности от онкологических заболеваний, а на долю немелкоклеточного рака легких приходится в среднем от 75 до 80% всех случаев рака легких в мире. Пятилетняя выживаемость больных с данной патологией составляет около 50%, и до настоящего времени не разработано терапевтического подхода, который смог бы увеличить этот срок. Хирургический метод лечения, а также радио – и химиотерапия оказываются при немелкоклеточном раке легких низкоэффективными (Daniel J.C. et al., 2003).

В последние годы исследователи и клиницисты возлагают большие надежды на принципиально новый подход к борьбе с онкологическими заболеваниями – генную терапию. К настоящему времени уже получен ряд многообещающих результатов генной терапии в доклинических и клинических испытаниях (Kawabe S. et al., 2001).

К началу 2005 года в мире проведено более 600 клинических испытаний применения генной терапии в лечении онкологических больных. В числе агентов генной терапии выступали вирусные векторы, несущие ген опухолевого супрессора *TP53* (rAd-p53). В этих клинических испытаниях продемонстрирована безопасность использования rAd-p53 как в качестве единственного терапевтического агента, так и в сочетании с традиционной химиотерапией, однако эффективность данного подхода однозначно не доказана (Junker K. et al., 2001; Nishizaki M. et al., 2001; Schuler M. et al., 2001; Swisher S.G. et al., 2003). В 2003 году препарат rAd-p53 (коммерческое название – Gendicine®) разрешен министерством здравоохранения Китая для применения при плоскоклеточном раке кожи (Peng Z., 2005).

Представлены результаты эффективности и безопасности применения rAd-p53 при немелкоклеточном раке легких в нерандомизированном двухцентровом клиническом испытании. В нем приняли участие 58 пациентов с диагнозом «немелкоклеточный плоскоклеточный рак легкого III и IV стадии». Мутация в гене белка – супрессора опухолевого роста *TP53* не была обязательным критерием включения, поскольку ранее в работах *in vitro* было показано, что внесение в клетку экзогенного гена *TP53* независимо от работы эндогенного p53 усиливало апоптоз злокачественных клеток (Kawabe S. et al., 2001). Следует заметить, что мутация гена *TP53*, чей продукт блокирует деление клетки, клеточное старение и индукцию апоптоза, обнаруживается в большинстве злокачественных опухолей человека и в 50% рака легких. Мутантный белок нефункционален, в связи с чем злокачественные клетки не претерпевают нормального клеточного старения и не подвержены апоптотической гибели (Junker K. et al., 2001). Пациенты, ранее получавшие химио– или радиотерапию, а также пациенты, чья ожидаемая продолжительность жизни составляла менее 3 месяцев, в исследование включены не были.

Контрольная группа пациентов (39 человек) получала стандартную инфузионную терапию комбинацией противоопухолевых препаратов флуорацила, навелбина и цисплатина, в то время как остальные 19 человек получали помимо инфузионной терапии также местные (непосредственно в опухолевые узлы) либо интраартериальные инъекции rAd-p53. Инъекции rAd-p53 (количество вирусных частиц в одной инъекции колебалось от 1 до 4×10^{12}) проводились максимум 4 раза, их количество зависело от стадии заболевания, а также от количества и размеров опухолевых узлов. Время наблюдения за состоянием пациентов составило 12 месяцев, при этом клиницисты оценивали следующие параметры: локальный ответ на терапию (изменение размеров опухоли); среднее время от начала терапии до прогрессии заболевания (прогрессией считалось увеличение размеров первичной опухоли на 20%, появление новых вторичных опухолевых узлов в легких, в регионарных лимфатических узлах и в удаленных от первичной опухоли органах в результате метастазирования, плевральная эффузия); среднюю выживаемость в группе.

Как в контрольной группе, так и в группе, получавшей сочетанную терапию, не отмечено развития угрожающих жизни негативных побочных эффектов. В контрольной группе общая выраженность негативных побочных эффектов оказалась выше, чем в группе сочетанной терапии. В последней не было отмечены такие побочные эффекты, как потеря аппетита, тошнота, рвота, боли и лейкопения, в то время как несколько сильнее был выражен гриппоподобный синдром, артралгия и миалгия.

Наиболее важным эффектом сочетанной терапии можно считать увеличение продолжительности периода до прогрессии заболевания: у пациентов, получавших инъекции rAd-p53, прогрессию заболевания отмечали в среднем через 7,7 месяцев, в то время как в контрольной группе – через 5,5 месяцев от начала терапии. Уменьшение размеров первичной опухоли на 50% и более наблюдалось по данным компьютерной томографии у 47,3% пациентов из группы сочетанной терапии и у 38,4% пациентов из контрольной группы. Несмотря на это, статистически значимых отличий в средней выживаемости пациентов из двух групп не отмечено: через 3, 6 и 12 месяцев наблюдения выживаемость составляла соответственно 94,74, 89,47 и 52,63% в группе сочетанной терапии и 92,31, 69,23 и 38,83%, соответственно в контрольной группе.

p53 играет ключевую роль в реакции клеток на стресс, включая повреждения ДНК. При клеточном стрессе p53 стабилизируется и регулирует экспрессию, локализацию и активность генов, продукты которых участвуют в процессах репарации ДНК, блокировки клеточного цикла, репликативного молчания клетки и апоптоза. Исследования на разных моделях показали, что реактивация активности p53 в опухолевых клетках, индукция стресса или комбинация этих методов могут значительно увеличить эффективность лечения злокачественных новообразований.

Результаты выполненного исследования можно назвать положительными, так как, несмотря на отсутствие увеличения среднего времени жизни больных, доказано достоверное улучшение качества их жизни. Авторы работы не проводили исследований экспрессии вектора в злокачественных клетках, сославшись на результаты более ранних работ, показавших, что внесение экзогенного p53 приводит к индукции экспрессии других генов – супрессоров опухолевого роста, таких как *MDM2*, *P21* и *BAK* (Swisher S.G. et al., 2003).

Остается неясным, какой из способов доставки данного вектора (местная инъекция либо инфузия в кровоток) является оптимальным. Несмотря на то, что теоретически именно местная инъекция должна обеспечивать наиболее эффективную доставку вектора в опухолевые клетки, поскольку при системной доставке он может подвергаться иммунной атаке и деградации (Moon C. et al., 2003), в некоторых случаях местная инъекция может оказаться технически невозможной, например, из-за малого размера и диффузного расположения опухолевых узлов. В данном исследовании существенных различий исследованных параметров в зависимости от способа доставки вектора не выявлено, что указывает на возможность доставки данного терапевтического агента через кровоток. Отмечено, что применение rAd-p53 снижало выраженность негативных побочных эффектов инфузионной терапии противоопухолевыми препаратами.

Данное исследование является предварительным, и для подтверждения полученных положительных результатов необходимо проведение расширенных мультицентровых клинических испытаний препарата Gendicine®. В исследование Guan Y-S. et al. (2009) вошло небольшое количество пациентов, при этом размеры контрольной группы и группы сочетанной терапии существенно различались. Группа сочетанной терапии оказалась примерно в 2 раза меньше контрольной, в связи с чем, возможно, по некоторым параметрам результаты в ней оказались более однородными, в то время как относительно продолжительности жизни больных не выявлено статистически достоверной разницы за счет широкого разброса данных. Для объективного вывода об эффективности генной терапии с помощью rAd-p53 необходим более длительный период наблюдения за состоянием пациентов, по крайней мере, в течение 5 лет (Григорян А.С., 2009е).

2.5. Генетическое предупреждение наследственных митохондриальных болезней

Митохондриальные болезни представляют собой одну из наиболее распространенных групп наследственных болезней человека и встречаются с частотой один случай на 3,5-6 тысяч человек (Taylor R.W. et al., 2005). В основном, они характеризуются поражением нервной и мышечной системы, благодаря чему появилось их другое название – митохондриальные миопатии (Finsterer J., 2007). Причина данных болезней лежит в мутациях митохондриальной ДНК, которые в большинстве случаев негативно влияют на биосинтез белков, задействованных в энергетическом метаболизме клетки. Этим и объясняется негативное влияние митохондриальных болезней, большей степенью на нервную и мышечную системы, так как клетки данных систем характеризуются высокой интенсивностью выработки и потребления энергии, и, соответственно, они наиболее чувствительны к патологическим изменениям энергетического обмена.

К настоящему времени не существует эффективных лекарственных средств для терапии данной группы заболеваний, а все доступное лечение носит симптоматический характер. Профилактика митохондриальных болезней при искусственном оплодотворении сводится к генетическому анализу митохондриальной ДНК в рамках предимплантационной генетической диагностики и имплантации эмбрионов, которые не несут соответствующих мутаций в митохондриальном геноме (Steffann J. et al., 2006).

Предложена технология, направленная на предотвращение развития митохондриальных болезней. Суть предложенного метода, разработанного в лаборатории Шухрата Миталипова, состоит в переносе геномной ДНК из материнской клетки, митохондриальная ДНК которой имеет мутации, в донорский овоцит с нормальным геномом митохондрий (Tachibana M. et al., 2009).

В своих экспериментах исследователи использовали клетки резус-макак. Для переноса ядерной ДНК применен метод переноса веретено-хромосомного комплекса (spindle-chromosomal complex transfer – SCCT). Данный метод дает возможность перенести геномную ДНК из донорского овоцита, находящегося на стадии метафазы II, в перивителлиновую полость безъядерного овоцита. Для слияния исследователи сначала использовали метод электропорации, но было обнаружено, что это вызывает активацию дальнейшего деления овоцита с образованием полярных телец. Для устранения данного артефакта предложено использовать альтернативную технику слияния с помощью вируса Сендаи, что позволило избежать нежелательной активации клеточного деления овоцита.

После этого осуществлена проверка репродуктивной эффективности реконструированных овоцитов и чистоты переноса митохондриальной ДНК с помощью метода SCCT. Из гибридных бластоцистов получили две линии

эмбриональных стволовых клеток (STES-1 and STES-2), которые несли на своей поверхности типичные маркеры плюрипотентности, такие как SSEA-4, TRA-1-60 и TRA-1-81, и имели нормальный кариотип. *In vivo* проверка репродуктивного потенциала нового метода проводилась путем имплантации ST-эмбрионов самкам резус-макак. Процент фертилизации и образования 8-клеточного эмбриона, морулы и бластоцисты оказался близким к показателям контрольной группы, в которой самкам имплантировались нативные овоциты, и намного превосходил результаты, полученные при использовании для слияния метода электропорации. Из девяти беременных самок три родили четверых детенышей (одна двойня). Все они характеризовались нормальным развитием.

Исследование митохондриальной ДНК детенышей путем анализа гипервариабельного района D-петли 1 (Byrne J.A. et al., 2007), RT-PCR и рестрикционного анализа показал, что во всех исследованных образцах присутствовала митохондриальная ДНК только от овоцита-акцептора.

Таким образом, авторам удалось разработать эффективный метод переноса геномной ДНК в клетки млекопитающих. Особую важность представляет тот факт, что исследователи впервые избежали гетероплазмии митохондриальной ДНК в акцепторных клетках, чего не удавалось достичь при использовании уже существующих методов (Sato A. et al., 2005).

Несмотря на все достоинства и перспективы, данный метод, как и отмечают сами авторы работы, имеет существенный недостаток, который состоит в использовании вируса для слияния кариопласта и цитопласта. Хотя проведенная проверка показала отсутствие вирусного генома в ST-клетках, остается риск, который может быть основным сдерживающим фактором при внедрении данного метода в практику (Стадник В.В., 2009).

2.6. Генная терапия анемии Фанкони

Возможность перепрограммирования соматических клеток взрослых для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (Takahashi K. et al., 2007) (iPS-клеток) открыла дорогу совершенно новым методам экспериментального моделирования человеческих заболеваний.

iPS-клетки, специфичные пациенту, могут стать основой нового метода лечения анемии Фанкони (АФ), генетического заболевания, при котором наблюдается несколько гематологических аномалий, ослабляющих способность к борьбе с инфекциями, ухудшающих доставку кислорода и свертываемость крови (Tischkowitz M. D. et al., 2003). Частота возникновения анемии Фанкони в Европе и США составляет 3 на 1 миллион населения (Tischkowitz M. D. et al., 2003). Существует 13 генов (один из них сцеплен с половой X хромосомой), мутации в которых могут стать причиной анемии Фанкони (Wang W., 2007). Все эти гены относятся к одному метаболическому пути. У пациентов с анемией Фанкони кроме нарушения

гемопоза также проявляется высокая предрасположенность к опухолеобразованию.

В настоящий момент анемию Фанкони лечат пересадкой костного мозга от здоровых братьев или сестер пациента, полностью или частично идентичных по антигенам главного комплекса гистосовместимости. Однако и в этом случае остаётся высокая вероятность отторжения и других осложнений.

В связи с тем, что недостаточность костного мозга у пациентов с анемией Фанкони проявляется в результате существенного снижения числа функциональных гемопозитических стволовых клеток (ГСК), то генетическую коррекцию рационально проводить не на самих ГСК, а на iPS-клетках, что и продемонстрировано в совместной работе испанских учёных. Они показали возможность получения iPS-клеток пациентов с анемией Фанкони и произвели их дальнейшую генетическую коррекцию. Такой подход позволит производить большое количество аутогенных, генетически стабильных гемопозитических клеток, которые можно будет использовать в лечении без опасности отторжения.

Генетическая коррекция заключалась во введении лентивирусного вектора, как наиболее устойчивого к подавлению экспрессии в человеческих клетках (Pfeifer A. et al., 2002), кодирующего исправленные белки метаболического пути АФ-FANCA или FANCD2. Перепрограммирование соматических клеток исследователи осуществляли путём инфицирования полученных кожных фибробластов от пациентов с анемией Фанкони ретровирусом, кодирующим меченые с N-конца белки OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC, сразу после генетической коррекции мутаций. Затем клетки высаживались на фидерный слой человеческих фибробластов, где в случае успешного перепрограммирования превращались в iPS-клетки и формировали колонии. Иммунофлуоресцентным анализом показано, что полученные клетки экспрессировали транскрипционные факторы и поверхностные маркеры, специфичные для плюрипотентных клеток, что подтверждает успешное перепрограммирование.

При дальнейшей характеристике iPS-клеток было подтверждено присутствие в них перепрограммирующих транскенов, однако уровень их экспрессии оказался низким, что доказал метод количественной ПЦР. Более того, была показана реактивация экспрессии собственных белков OCT4 и c-MYC, а так же других транскрипционных факторов, ассоциированных с плюрипотентностью. Это говорит о том, что присутствие экзогенных перепрограммирующих агентов необходимо лишь на начальной стадии.

В условиях *in vitro* полученные iPS-клетки были способны дифференцироваться в энтодермальные, эктодермальные и мезодермальные производные, о чём можно судить по клеточной морфологии, а так же по иммунофлуоресцентному окрашиванию против α -фетопротеина/FOXA2, TuJ1/GFAP и α -актина, соответственно.

В ходе исследования выполнены все этапы (за исключением трансплантации), необходимые для лечения анемии Фанкони с помощью генетической коррекции iPS-клеток. Фактически, в настоящее время началу клинических испытаний препятствует лишь отсутствие эффективных методов получения iPS-клеток без использования генетических конструкций.

Функциональная активность метаболического пути АФ в полученных клетках проверялась следующим образом. С помощью высокоэнергетического ультрафиолетового воздействия в клетках индуцировалось накопление заблокированных репликационных вилок, куда в норме перемещается белок FANCD2 (Bogliolo M. et al., 2007). Такой эффект наблюдался у генетически скорректированных клеток, что говорит о полном восстановлении АФ пути, то есть излечении на клеточном уровне.

В работе показана способность полученных iPS-клеток дифференцироваться в гемопоэтические клетки. В культурах выявлены CD34⁽⁺⁾ и CD45⁽⁺⁾-клетки. Очищенные CD34⁽⁺⁾-клетки, полученные из генетически скорректированных iPS-клеток пациентов с анемией Фалькони, формировали обширные эритроидные и миелоидные колонии, сравнимые с контролем. Кроме того, было подтверждено, что АФ путь в таких клетках полностью восстановлен.

В данной работе впервые показана принципиальная возможность лечения человеческих генетических заболеваний путём комбинации генной терапии и технологии iPS-клеток. Однако, до того как новый метод будет применен в клинике, нужно решить еще большое количество проблем. Несмотря на то, что в процессе перепрограммирования уменьшается экспрессия введенных трансгенов, остаётся опасность их реактивации при дифференцировке, что может приводить к образованию опухолей. Кроме того, существует опасность инфицирования при использовании вирусных векторов для доставки трансгенов. Ясно одно, необходимо разрабатывать технологии перепрограммирования без введения чужеродных генов (Новик П., 2009; Zhou H. et al., 2009).

2.7. Генная терапия X-сцепленной формы адренолейкодистрофии

Наследственная X-сцепленная форма адренолейкодистрофии (АЛД) представляет собой фатальное демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы, причиной которого являются мутации в гене *ABCD1*, кодирующем белок-транспортёр ALDP, локализованный в мембранах пероксисом. В пероксисомах олигодендроцитов и клеток микроглии этот белок участвует в транспорте эфиров длинноцепочечных жирных кислот (ДЦЖК; более 22 атомов углерода в алифатическом «хвосте»), что необходимо для миелинизации нервных волокон. В результате мутации развивается мультифокальный демиелинизирующий процесс,

который приводит к гибели больного, как правило, еще в подростковом возрасте.

Единственным способом излечения этого врожденного заболевания является аллогенная трансплантация гемопоэтических клеток. Успех подобной терапии может быть достигнут только на ранних стадиях болезни и при наличии подходящего донора. Поскольку микроглиальные клетки имеют миелоидное происхождение, постольку полагают, что замещение мутантных гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников реципиента «здоровыми» клетками донора позволяет восстановить процесс миелинизации нервных волокон в ЦНС. Установлено, что костномозговые клетки человека, трансплантированные мышам, мигрируют в головной мозг и дифференцируются в микроглиальные клетки, экспрессирующие ALDP (Asheuer M. et al., 2004).

Долгосрочные результаты клинического испытания по применению трансплантации генетически «исправленных» аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), полученных на двух пациентах (в возрасте 7,5 и 7 лет, у которых имелись мутации в гене *ABCD1*) с адренолейкодистрофией, опубликованы в журнале «Science». Несмотря на прогрессирующую демиелинизацию и недостаточность функции надпочечников, а также отсутствие совместимого донора не позволяло проведение аллогенной трансплантации (Cartier N. et al., 2009).

После процедуры G-CSF-индуцированной мобилизации CD34⁽⁺⁾-клетки выделялись с помощью иммуномагнитной сепарации. Для генетической коррекции клеток пациентов использовали лентивирусный вектор на основе ВИЧ-1, содержащий интактную копию гена *ABCD1*. В результате трансдукции 50 и 33% трансплантированных CD34⁽⁺⁾-клеток экспрессировали функционально активный белок ALDP, что привело к более, чем двукратному (55 и 68%) снижению в этих клетках уровня ДЦЖК. Инфузию модифицированных CD34⁽⁺⁾-клеток проводили после процедуры полной миелоабляции (циклофосфамид и бисульфан), что важно для успешного приживания трансплантата, поскольку лентивирусная коррекция не дает трансплантированным клеткам пролиферативного преимущества по сравнению с остаточными мутантными ГСК. Восстановление гемопоэза у пациентов наступило соответственно на 13-й и 15-й день.

Посттрансплантационный анализ показал, что со временем экспрессия ALDP в мононуклеарных клетках периферической крови постепенно снижается, стабилизируясь на уровне 10 и 15% спустя 30 и 24 месяцев после трансплантации (соответственно для 1-го и 2-го пациентов). Разные популяции клеток крови экспрессировали примерно одинаковое количество ALDP (9-14%). Уровень экспрессии ALDP в CD34⁽⁺⁾-клетках оказался выше - 18%.

Поскольку места геномной интеграции вектора представляют собой высокоспецифичный маркер для анализа отдельных клеточных клонов, авторы работы провели детальное исследование репертуара инсерционных

сайтов (ИС) с помощью амплификации уникальных геномных последовательностей, фланкирующих интегрированный вектор (LAM-PCR – полимеразная цепная реакция, опосредованная линейной амплификацией) (Schmidt M. et al., 2007), и последующего секвенирования полученного ампликона. Обнаружено 2217 и 1380 уникальных ИС, большая доля которых располагалась в областях, богатых генами. Этот подход позволил выявить 1,4 и 4,6% ИС, присутствующих, как в лимфоидных, так и в миелоидных клетках. Это означает, что вектор был интегрирован в истинные ГСК, способные давать начало клеткам обеих ветвей гемопоэза. Кроме того, количественный анализ инсерционных сайтов показал, что клональный репертуар распределялся равномерно: не обнаружены такие ИС, интеграция вектора в которые приводила бы к активной пролиферации клона и клональному доминированию.

Спустя 14-16 месяцев после трансплантации у пациентов прекратилась прогрессирующая демиелинизация пирамидального тракта, фронтального белого вещества и других пораженных зон головного мозга. Это сопровождалось стабилизацией неврологических и когнитивных функций и снижением уровня ДЦЖК в плазме крови на 38-39%. Важно отметить, что коррекция уровня ДЦЖК оказалась значительно больше ожидаемой, поскольку функционально полноценный ALDP экспрессировало лишь 14% моноцитов.

Успешные результаты данного клинического испытания во многом обусловлены верным выбором вектора для генетической коррекции CD34⁽⁺⁾-клеток. Сокращенный протокол для трансдукции и стабильная экспрессия трансгена, несмотря на отсутствие клонального доминирования у трансдуцированных клеток, являются важными преимуществами использованного лентивирусного вектора на основе ВИЧ-1. Кроме того, данный вектор содержит инактивирующийся промотор/энхансер длинных терминальных повторов (LTR), что предотвращает генотоксические эффекты, обусловленные транскрипционно активными LTR (Montini E. et al., 2009), а значит, снижает вероятность онкотрансформации модифицированных клеток.

Выводом этой работы явилось то, что стабильная экспрессия ALDP лишь в 15% CD14⁽⁺⁾-моноцитов достаточна для купирования демиелинизирующего процесса и неврологических нарушений у пациентов. Это кардинально отличается от результатов аллогенной трансплантации ГСК у больных аденолейкодистрофией, где блокада прогрессирующей демиелинизации в головном мозге наблюдалась только при более чем 80%-ом приживлении донорских кроветворных клеток. Авторы полагают, что такая разница может быть обусловлена выраженной экспрессией белка ALDP в генетически модифицированных микроглиальных клетках, что позволяет купировать демиелинизацию нервной ткани.

2008 год явился годом возвращения генной терапии в ряды перспективных подходов для лечения наследственных заболеваний (Naldini

L., 2009). Успешные долгосрочные результаты также получены при лечении аутосомно-рецессивной формы тяжелого комбинированного иммунодефицита (дефицит аденозиндезаминазы) (Aiuti A. et al., 2009) и амавроза Лебера (врожденная дистрофия сетчатки глаза) (Maguire A. et al., 2009). Клинические испытания с привлечением большего числа пациентов должны в дальнейшем определить развитие генной терапии рассматриваемой группы наследственных заболеваний (Лелявский А., 2010).

2.8. Генная терапия злокачественных новообразований

Транскрипционный фактор p53 играет важную роль в процессах регуляции клеточного цикла, супрессии опухолей и предупреждении возникновения рака. p53 способен останавливать клеточный цикл на стадии G1-S посредством активации транскрипции гена белка p21(WAF1), который является ингибитором CDK2. Остановка клеточного цикла между G1-S фазами вызывается повреждениями ДНК, что дает возможность системам репарации восстановить нормальную структуру ДНК. Если же повреждения не поддаются полной репарации, то p53 способен индуцировать апоптоз таких клеток через активацию проапоптического белка Apaf-1 (Lin L. et al., 2006).

p53 представляет собой наиболее используемую мишень для генной терапии злокачественных новообразований (Zuckerman V. et al., 2009). Этот факт имеет под собой научную основу, поскольку мутации гена p53 встречаются, приблизительно, в половине случаев злокачественных новообразований. В настоящий момент разработано большое количество препаратов для лечения злокачественных новообразований, которые должны заменять мутантную форму *TP53* на нормальную.

Одним из самых важных этапов разработки данного типа лекарственных средств являются клинические испытания. Осуществлена первая фаза клинических испытаний препарата гендицин (rAd-p53) (Zhang S. et al., 2009), представляющего собой рекомбинантный аденовирус несущий ген *TP53* дикого типа (Han D.M. et al., 2003). Препарат вводился интраэпителиально на протяжении двух недель 18 пациентам с лейкоплакией ротовой полости. Обнаружены некоторые побочные эффекты, такие как временная боль в месте инъекций и повышение температуры тела до +38,9°C после введения препарата, примерно, у трети пациентов на протяжении 12 часов после инъекции. У 15 из 18 пациентов выявлен эпидермальный некроз и повышение экспрессии белка p53 в клетках эпителия ротовой полости. Полностью выздоровели четыре пациента (22,2% от общего числа), у которых отсутствовали рецидивы через полгода после окончания лечения. У девяти больных (50%) обнаружено уменьшение размеров зоны поражения в сравнении с данным показателем до начала терапии гендицином. Только у

двух больных, получавших инъекции гендицина, состояние осталось без изменений.

Таким образом, гендицин хорошо проявил себя при терапии лейкоплакии ротовой полости, что дает пациентам высокие шансы на избежание оперативного вмешательства и выздоровление.

Проведена вторая фаза клинических исследований препарата INGN 201 (Ad5CMV-p53), состоящего из рекомбинантного аденовируса и гена p53 дикого типа (Yoo G.H. et al., 2009). Исследования выполнены на 13 пациентах с плоскоклеточной карциномой ротовой полости, глотки и гортани.

Препарат вводили дозами по $(2,5 \pm 1,0)^{12}$ вирусных частиц. Во время операции одну дозу вводили в паравульнарные ткани после удаления опухоли, следующую – сразу после операции в операционную рану на шее, еще одна доза вводилась на 2-3-и сутки после оперативного вмешательства через дренажные катетеры. Препарат не вводился в сосуды и нервы. Кроме введения INGN 201 пациенты получали химиотерапию цисплатином и радиотерапию.

Из 13 пациентов за период наблюдения 3 умерли, причем все от следствий рецидива карциномы. Таким образом, процент рецидивов при использовании INGN 201 составил 23%, тогда как стандартный уровень данного показателя без применения генной терапии колебался в пределах 25-40%. Следовательно, говорить о высокой эффективности INGN 201 по результатам данного исследования нельзя.

В то же время, авторы данной работы делают основной акцент на том, что им удалось провести клинические испытания препарата нового поколения без привлечения специализированных экспериментальных госпиталей, что в будущем может значительно ускорить процесс клинических испытаний. Исследователи отмечают также очень низкий уровень вовлеченности пациентов (2-4% от общего числа) в клинические испытания, что связано, в первую очередь, с нежеланием рядовых врачей информировать больных о данных типах исследований.

Несмотря на некоторую эффективность исследованных препаратов p53, остается проблема недостаточного количества пациентов при проведении клинических испытаний, что снижает достоверность исследований и значительно пролонгирует срок внедрения новых препаратов в клиническую практику (Стадник В., 2010; Yoo G.H. et al., 2009).

2.9. Генная терапия критической ишемии нижних конечностей

Одним из путей увеличения эффективности генной терапии критической ишемии нижних конечностей является создание векторов, обладающих высокой экспрессионной активностью. В анализируемой работе испытывался плазмидный вектор PC4W, имеющий ряд регуляторных элементов, которые

позволяют повысить экспрессию трансгена в клетках и тканях животных. Плазмидные конструкции на базе вектора РС4W, несущие кДНК генов человеческого HGF (pC4W-hHGFopt), VEGF1B5 (pC4W-hVEGFopt) и ангиопоэтина-1 (pC4W-hAng-1opt), испытывались *in vitro* в культуре клеток НЕК293Т. Уровень факторов роста после кальций-фосфатной трансфекции оценивался по данным вестерн-блоттинга и иммуноферментного анализа и сравнивался с коммерческими плазмидами pсDNA3, несущими гены аналогичных ростовых факторов. Для оценки экспрессии факторов роста в ишемизированной ткани мышей BALB-с использовался метод ПЦР с обратной транскрипцией.

Данные иммуноблоттинга и иммуноферментного анализа кондиционных сред трансфицированных клеток показали, что при использовании вектора РС4W уровень факторов роста удалось повысить в 2-2,5 раза по сравнению с коммерческими плазмидами pсDNA3. Дополнительное увеличение экспрессии достигается за счет оптимизации нуклеотидных последовательностей экспрессируемых генов. Методом ПЦР установлено, что в течение 14 суток в ишемизированной ткани сохраняется мРНК человеческого HGF.

Полученные результаты показывают, что новые плазмидные конструкции, предназначенные для экспрессии ангиогенных факторов роста как *in vitro*, так и *in vivo* обладают высокой активностью в культуре клеток человека и в тканях животных и позволяют продуцировать факторы hVEGF1B5, hHGF и hAng-1 в более высоких количествах, чем конструкции на базе коммерческого вектора pсDNA3, несущего неоптимизированные последовательности генов этих факторов. Конструкции в настоящий момент проходят предклинические испытания на моделях ишемии у экспериментальных животных и в дальнейшем будут использованы для разработки комбинированной генной терапии ишемических заболеваний (Макаревич П.И. и др., 2010).

В соответствии с действующим законодательством и на основании официально выполненных доклинических исследований, проведены I-II фазы клинических исследований методом генной терапии ишемии нижних конечностей II-III стадии по А.В. Покровскому-Фонтейну на базе трех лечебных учреждений. В простое открытое рандомизированное многоцентровое исследование включено 45 пациентов, 10 из которых составили группу сравнения. Исследование проведено в строгом соответствии с национальными правилами этики и достоверности клинических исследований. Назначение исследуемого препарата производилось на фоне стандартной терапии в соответствии с протоколами ведения больных, используемыми в участвующей в исследовании клинике. Пациенты группы испытуемых получали генотерапевтический препарат на основе высокоочищенной сверхскрученной формы плазмиды pCMV-VEGF1B5, кодирующей эндотелиальный фактор роста сосудов – VEGF (ОАО «Институт Стволовых Клеток Человека», Москва, Россия). В результате была

определена безопасность и переносимость введения препарата (Деев Р.В. и др., 2010).

2.10. Генная терапия сердечно-сосудистых заболеваний

С развитием генной и клеточной терапии связывают надежды на повышение эффективности лечения сердечно-сосудистых заболеваний, прежде всего, неоперабельных случаев ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда, сердечной недостаточности, критической ишемии нижних конечностей.

Экспериментальные исследования продемонстрировали возможность стимуляции ангиогенеза, регенераторных процессов в сердце и ишемизированных конечностях животных с помощью генной и клеточной терапии.

Однако результаты клинического применения этих методов довольно скромные. Одним из подходов к повышению эффективности генной и клеточной терапии может быть генетическая модификация стволовых и прогениторных клеток – своеобразный альянс клеточной и генной терапии, позволяющий нейтрализовать недостатки и усилить преимущества обеих методик.

Для лечения сердечно-сосудистых заболеваний в эксперименте используются генетически модифицированные клетки для стимуляции ангиогенеза и регенеративных процессов в миокарде, создания биологических пейсмейкеров, повышения выживаемости, хоуминга и интеграции клеток при трансплантации в поврежденную ткань. Часть из них перспективна для использования в клинической практике (Шевченко Е.К. и др., 2010).

2.11. Генная терапия нейродегенеративных заболеваний

Эффективных методов лечения нейродегенеративных заболеваний на сегодняшний день не существует. В эксперименте потеря нейронов, вызванная мутациями известных генов, может быть остановлена путём введения в геном клетки-мишени терапевтического гена с целью повышения жизненной стойкости нейрона, или путём замены погибших нейронов на молодые здоровые нервные клетки путём нейротрансплантации стволовых клеток или их потомков, предифференцированных в нейрональном направлении.

К настоящему времени обобщены результаты по генной терапии с помощью антисмысловых олигонуклеотидов, РНК-интерференции и вирусных систем. Рассмотрены преимущества и недостатки нейротрансплантации эмбриональных и стволовых клеток взрослого организма. До настоящего времени в мировой научной литературе отсутствовали прямые указания на возможность применения генетически модифицированных клеток

пуповинной крови для клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний. На этом основании представлена гипотеза о том, что генетически модифицированные стволовые клетки пуповинной крови, трансфицированные плазмидным вектором, одновременно экспрессирующим клонированные нейрональную молекулу адгезии L1 сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), значительно усилят терапевтический эффект стволовых клеток пуповинной крови у трансгенных G93A мышей с фенотипом бокового амиотрофического склероза.

Нейродегенеративные заболевания характеризуются прогрессирующей гибелью нервных клеток головного и спинного мозга. Начиная с работ Сантьяго Рамон-и-Кахаля, проблема регенерации нейронов остаётся одной из важнейших в нейробиологии. До сих пор в научной литературе резонирует высказывание Кахаля: «...в конце развития родники роста и регенерации аксонов и дендритов высыхают безвозвратно. Посередине взрослости нервные пути – нечто фиксированное, законченное и неизменное. Всё может погибнуть, ничто не может регенерировать. Науке будущего предписано изменить, если возможно, это суровое правило».

Сегодня процесс клеточной регенерации в центральной нервной системе не считается нереализованным. Вместе с открытием нейрональной стволовой клетки, опровергнувшим догму о нереальности клеточного механизма регенерации нейронов в ЦНС, в настоящее время разрушено и представление о невозможности синтеза белка в аксоне. Функциональная значимость нервных клеток для организма предусматривает их потенциальную возможность к регенерации за счёт стволовых клеток, а значительная протяжённость аксонов в составе периферических нервов предполагает существование в аксоплазме локальных биохимических процессов жизнеобеспечения (Семченко В.В. и др., 2008). Очевидно, что подобные открытия в нейробиологии вместе с прогрессом молекулярных и клеточных технологий открывают широкие перспективы разработки новых способов лечения неврологических болезней.

Нейродегенеративные заболевания затрагивают разные структуры ЦНС и типы нервных клеток. Необратимой дегенерации подвергаются холинергические нейроны спинного мозга и ствола головного мозга при боковом амиотрофическом склерозе и спинальной мышечной атрофии, дофаминергические нейроны чёрного вещества (*substantia nigra*) при болезни Паркинсона, ГАВА-ергические нейроны базальных ганглиев при хорее Хантингтона, нейроны головного мозга при болезни Альцгеймера. Поддержание жизни нейронов, вступивших в патологический процесс, и восстановление утраченных межклеточных связей в нервной ткани могут существенно повысить качество и продолжительность жизни больных (Семченко В.В. и др., 2008).

Перспективными методами лечения больных, страдающих нейродегенеративными заболеваниями, считаются коррекция экспрессии гена, ответственного за развитие заболевания, трансплантация стволовых

клеток, а также сочетание генной инженерии с клеточной терапией – трансплантация генетически модифицированных стволовых клеток.

Для изучения влияния конкретных генов на развитие заболевания широко применяют мутантные линии животных, в первую очередь, – генетически модифицированных мышей. Мышь является наиболее изученной разновидностью млекопитающих. На сегодняшний день имеется полная расшифровка генома мыши (20 тысяч генов), который на 80% гомологичен геному человека (20-25 тысяч генов). Поэтому мыши, полученные с помощью генной инженерии, являются удобной биологической моделью для изучения механизмов патогенеза заболеваний, связанных с мутацией известного гена, а также разработки методов лечения заболевания, вызванного мутацией данного гена (Исламов Р.Р. и др., 2007).

2.11.1. Болезнь Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера – первичное дегенеративное заболевание головного мозга, характеризующееся прогрессирующей гибелью нервных клеток гиппокампа и коры большого мозга. Гистологическое исследование нервной ткани выявляет отложения р-амилоидного белка в виде сенильных бляшек и агрегаты фосфорилированной формы tau-белка в составе нейрофибриллярных клубков. В патогенезе заболевания основное значение имеет генетическая предрасположенность. При болезни Альцгеймера найдены дефекты генов *APP* (21 q21.3-q22.05), *APOE* (19q13.2), *AD2* (19cen-q13.2), *PSEN1* (14q24.3) и *PSEN2* (1q31-q42). Модели болезни Альцгеймера на мышах основаны на экспрессии одного из дефектных генов человека. У трансгенных мышей отложение аберрантного белка сопровождается дегенерацией нервных клеток головного мозга и нарушениями памяти, как у человека. Например, мыши *APP^{swe}* экспрессируют ген, кодирующий предшественник р-амилоидного белка (Jankowsky J.L. et al., 2005), а трансгенные мыши *APP^{swe}, PSEN1^{dE9}* экспрессируют дефектные гены предшественника р-амилоидного белка и пресенилина-1 (Jankowsky J.L. et al., 2004).

2.11.2. Болезнь Паркинсона

Болезнь Паркинсона – идиопатическое и медленно прогрессирующее дегенеративное заболевание ЦНС, занимающее второе место по частоте встречаемости среди нейродегенеративных заболеваний. Характеризуется замедленностью движений, ригидностью мышц, тремором в покое и нарушением позных рефлексов. В основе заболевания лежит поражение дофаминергических нейронов чёрного вещества и других нейронов ствола головного мозга, содержащих дофамин. Причины гибели нейронов при спорадической форме неизвестны. Менделевское наследование встречается в 5% случаев этого заболевания. Семейная болезнь Паркинсона 1-го типа

возникает вследствие мутаций гена α -синуклеина (*SNCA*, 4q21-q23), кодирующего пресинаптический белок. Выявлены также мутации генов *PARK2*, *PARK7*, *NR4A2*. У гомозиготных мышей, экспрессирующих дефектный α -синуклеин человека (A53T; аланин замещён на треонин в позиции 53), развиваются двигательные расстройства, приводящие к параличу скелетных мышц и, как следствие, к смертельному исходу (Giasson V.I. et al., 2002).

2.11.3. Боковой амиотрофический склероз

Боковой амиотрофический склероз принадлежит к группе нейродегенеративных заболеваний с прогрессирующей гибелью двигательных нейронов головного и спинного мозга. Наиболее выраженные изменения происходят в передних рогах спинного мозга в шейных и поясничных сегментах, в двигательных ядрах ствола мозга, в двигательной зоне коры головного мозга. Причины гибели нейронов при наиболее частой (спорадической) форме заболевания неизвестны, но часть случаев семейной формы заболевания обусловлена доминантными мутациями гена *SOD1* (21q22.1-q22.2), кодирующего Cu/Zn-супероксиддисмутазу. *SOD1* – главный фермент антиоксидантной защиты клетки, который локализуется в ядре, цитозоле и митохондриях. Гомодимер состоит из двух субъединиц, каждая из которых содержит один Cu-связывающий домен, один Zn-связывающий домен и дисульфидный мостик.

Известно более 100 мутаций гена *SOD1*. Преимущественно это точечные мутации, характеризующиеся заменой одной аминокислоты из 153 аминокислотных остатков белка. Трансгенные мыши G93A, экспрессирующие мутантный *Sod1* (Gly93-Ala; глицин замещён на аланин в позиции 93), характеризуются прогрессирующей дегенерацией мотонейронов, как при боковом амиотрофическом склерозе человека. Гомозиготные G93A мыши на фоне прогрессирования паралича скелетных мышц умирают в возрасте 4-5 месяцев.

Трансплантацию генетически модифицированных клеток (стволовых, предшественниц, дифференцированных) активно исследуют как способ доставки ростовых факторов и молекул адгезии в поврежденную нервную ткань для поддержания жизнеспособности нейронов, обеспечения регенерации нервных отростков и восстановления утраченных межклеточных контактов.

Для лечения бокового амиотрофического склероза на модели трансгенных мышей G93A сконструировали плазмидный вектор pBud-VEGF-L1CAM, одновременно экспрессирующий молекулы сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и нейронной молекулы адгезии L1 (L1CAM).

Для доставки вектора в спинной мозг мышей использовали мононуклеарные клетки пуповинной крови человека. Трансплантация

генетически модифицированных клеток, трансфицированных плазмидными векторами pBud-VEGF-L1CAM, pBud-VEGF-EGFP и pBud-EGFP-L1CAM, выполнена путём инъекции (1×10^6 клеток) в ретроорбитальное пространство мышей. Через 2 недели после трансплантации для идентификации и фенотипирования генетически модифицированных мононуклеарных клеток проводили двойное иммунофлуоресцентное окрашивание срезов спинного мозга мышей с помощью антител к ядерному антигену человека (HNA) и одному из клеточных маркёров (эндотелиоцитов – CD34, астроцитов – S100, олигодендроцитов – OSP, микроглии – Iba1).

При исследовании гистологических срезов спинного мозга обнаружили HNA⁽⁺⁾CD34⁽⁺⁾-клетки как в белом, так и в сером веществе во всех экспериментальных группах. Маркёры макро- и микроглии в HNA⁽⁺⁾-клетках не выявлены.

Таким образом, сверхэкспрессия генов *VEGF* и/или *L1CAM* в мононуклеарных клетках пуповинной крови человека не влияет на их способность дифференцироваться в эндотелиоциты в спинном мозге трансгенных мышей G93A. Целесообразность генетической модификации мононуклеарных клеток пуповинной крови геном молекулы адгезии L1cam подтверждена повышенной жизнеспособностью трансплантированных клеток, а геном сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF – поддержанием дифференцировки эндотелиоцитов и нейропротекторным действием на повреждённые нейроны (Ризванов А.А. и др., 2010).

2.11.4. Хорея Гентингтона

Хорея Гентингтона – наследственное (аутосомно-доминантное) нейродегенеративное заболевание, характеризующееся прогрессирующей гибелью ГАБА-ергических нервных клеток в базальных ганглиях, особенно в хвостатом ядре и скорлупе. Патогенез заболевания связан с мутацией гена хантингтина *HTT*(4p16-3). Мутантный ген содержит увеличенное число повторов САG-кодонов и экспрессирует белок, полиглутаминовый трек которого содержит более 40 остатков глутамина при нормальной длине 11-34 остатков. Модель заболевания – трансгенные мыши R6/2; мутированный *Htt* содержит более 150 повторов САG кодонов и кодирует aberrантный белок с увеличенным полиглутаминовым треком (Mangiarini L. et al., 1996).

Полученные результаты указывают на необходимость разработки и развития альтернативных подходов в терапии хореи Гентингтона, которые направлены на устранение негативных эффектов мутантного хантингтина (Martin B. et al., 2008). В частности, действие новых лекарственных средств может быть направлено:

– на контроль токсичных для стриальных нейронов сигналов от нигростриальных и кортикостриальных путей;

– на повышение жизнеспособности стриальных нейронов за счет обеспечения трофических сигналов, восстановления функции митохондрий и предотвращения апоптотической гибели клеток;

– на блокирование агрегации хантингина и усиление его протеолитической деградации.

Особое место занимает генная терапия хорей Гентингтона, с помощью которой можно добиться продукции нейротрофических факторов в зоне поражения либо непосредственного ингибирования экспрессии хантингина с помощью РНК-интерференции. Некоторые из этих лекарств «нового поколения» (преимущественно нейропротекторные агенты – креатин, ненасыщенные жирные кислоты) уже находятся на стадии клинических испытаний (Лелявский А., 2009; Fulmer T., 2009).

2.11.5. Спинальная мышечная атрофия

Спинальная мышечная атрофия – аутомное рецессивное заболевание, характеризующееся дегенерацией двигательных нейронов передних рогов спинного мозга и ствола мозга. Спинальная мышечная атрофия – самая частая причина смертности в раннем детском возрасте в результате мутации гена выживания мотонейронов *SMN1* (5q13.2). Трансгенные мыши, экспрессирующие дефектный ген *Smn1* и дикий тип гена *Smn2*, после рождения выживают в течение 4-6 суток. Дрожание мышц не способны передвигаться, у них нарушен сосательный рефлекс, затруднено дыхание. Клинические и гистологические характеристики заболевания соответствуют типу III спинальной мышечной атрофии человека. У мышей, экспрессирующих только дефектный ген *Smn1* (без трансгена *Smn2*), смерть наступает во внутриутробном периоде (Monani U.R. et al., 2000).

2.12. Генная терапия гемофилии

Опубликованы результаты I/II фаз клинических испытаний метода генотерапии гемофилии В, связанной с дефицитом фактора IX. Введение аденовирусного вектора, несущего ген фактора IX, подтвердило свою эффективность и безопасность в преклинических испытаниях. Вирусную генетическую конструкцию вводили в печёночную артерию семи пациентам с тяжёлой гемофилией В.

Выбранная доза вируса оказалась нетоксичной. Осложнений, связанных с процедурой, не наблюдалось. Уровень IX фактора значительно повысился у двух пациентов в течение нескольких недель, что указывает на трансдукцию гепатоцитов *in vivo* и на терапевтическую эффективность метода, которая объясняется появлением нейтрализующих антител, повышением уровня печёночных аминаз, иммунным ответом на собственные трансдуцированные гепатоциты. Эффект от лечения постепенно нивелировался (Manno C.S. et al., 2006).

2.13. Генная терапия мышечных дистрофий

Мышечные дистрофии – это группа наследственных заболеваний, которые характеризуются прогрессирующей мышечной слабостью и потерей мышечных тканей. В настоящее время все дистрофии считаются заболеваниями неизлечимыми. В некоторых случаях болезнь приводит к смерти.

Мышечные дистрофии различаются по группам поврежденных мышц, возрасту, при котором начинается болезнь, и скорости ее прогрессирования. Молекулярной причиной, лежащей в основе многих дистрофий, являются мутации в генах, кодирующих компоненты дистрофин-гликопротеинового комплекса, который связывает миофибрильный цитоскелет с внеклеточным матриксом (OBrien K.F. et al., 2001; Durbeej M. et al., 2002; Ehmsen J. et al., 2002).

Наиболее тяжело протекает часто встречающаяся мышечная дистрофия Дюшенна (МДД), которая поражает мальчиков с частотой, равной 1 на 3500. Она проявляется в 1-2-летнем возрасте и характеризуется потерей независимого передвижения уже к 10 годам. Больные МДД, как правило, умирают в возрасте 15-25 лет от сердечной или легочной недостаточности вследствие атрофии дыхательных и сердечной мышц.

Сходными симптомами и причиной возникновения характеризуется мышечная дистрофия Беккера (МДБ), однако протекает это заболевание в менее тяжелой форме. Обе болезни являются следствием мутаций в гене дистрофина *DMD*, который локализован на коротком плече X-хромосомы (Xp21.2) и является самым большим из известных генов человека. Он содержит 79 экзонов и составляет приблизительно 0,1% всего генома человека. Этот ген кодирует мышечный белок дистрофин с молекулярным весом 427 кДа, который является основным структурным белком, стабилизирующим сарколемму мышечного волокна. Своим N-концом он связывается с актином – главным компонентом внутриклеточного цитоскелета, а C-концом – с группой дистрофин ассоциированных дистро- и саркогликанов – белков сарколеммы, и через них связывается с основным белком внеклеточного матрикса – ламинином.

Мутации в гене дистрофина приводят к полному отсутствию или сильному снижению уровня дистрофина в случае МДД, либо к образованию частично функционального дистрофина в случае МДБ. Отсутствие или функциональная недостаточность этого белка приводит к нарушению целостности клеточной мембраны и является причиной запуска процессов дегенерации мышечного волокна. Результатом этого процесса является повышение проницаемости мембран и возникновение в них физических разрывов, что приводит к выходу ферментов из мышц в сыворотку крови (повышение в сыворотке крови активности креатинкиназы является биохимическим маркером МДД и МДБ). На начальных стадиях заболевания

дегенерация мышечных волокон компенсируется активной регенерацией фибрилл, благодаря делению и слиянию мышечных сателлитных клеток. Однако с возрастом этот процесс становится менее эффективным, что приводит к прогрессирующей мышечной слабости.

В настоящее время при отсутствии эффективных медикаментозных способов возлагаются большие надежды на использование методов генной и клеточной терапии для лечения мышечных дистрофий. Задачей этих способов лечения является восстановление синтеза дистрофина в мышечных клетках, что достигается либо путем встраивания в клетки нормального гена дистрофина, либо коррекцией мутаций в самом гене или в иРНК.

Основное различие генной и клеточной терапий заключается в способе доставки нормального гена дистрофина в мышечную клетку. Генноинженерные подходы доставки гена используют, как правило, вирусные векторы. В экспериментах на мышах продемонстрирована достаточно эффективная и долговременная трансфекция скелетных и сердечной мышц, а также мышц диафрагмы после введения аденовирусных, ретровирусных или лентивирусных векторов, доставляющих функциональный ген дистрофина или минидистрофина (Harper S.Q. et al., 2002).

Вместе с тем, использование вирусных носителей, особенно в экспериментах *in vivo*, наталкивается на существенные методические трудности, к которым, например, относятся недостаточная пакующая способность ретровирусов и необходимость наличия клеток-хелперов. Наибольшим препятствием использования вирусных векторов для доставки генетических конструкций является выраженный иммунный ответ реципиента на вирусные антигены.

Несмотря на огромный объем работ по модификации генома вирусаносителя и сокращению его до минимально возможного размера, иммунный ответ, тем не менее, сохраняется и делает бессмысленным повторное введение генноинженерных конструкций. В результате оказывается невозможно достичь такого уровня трансфекции, при котором наступает эффект лечения. Большинство исследователей полагает, что достижение терапевтического эффекта возможно при успешной трансфекции не менее 20% (по последним данным – даже 40%) всех мышечных волокон, включая мышцы сердца и диафрагмы. При этом основными критериями эффективности трансфекции являются появление дистрофин-положительных мышечных волокон, нормализация уровня креатинкиназы в сыворотке крови, изменение физиологических параметров.

Существуют также невирусные способы доставки к ДНК гена дистрофина, которые включают в себя баллистическую трансфекцию, методы электропорации (электрошока), введение генетических конструкций в составе липосом, либо упакованных с помощью олигопептидов, молекулярных конъюгатов или полимерных носителей. Эти способы не вызывают такого иммунного ответа, как вирусные векторы, однако

способность к трансформации у большинства из них ниже.

Несмотря на довольно интенсивные исследования на животных моделях, до настоящего времени клинические испытания генноинженерных методов лечения дистрофий на больных людях практически не проводились.

Существует еще один подход к лечению дистрофий – активация синтеза в мышечных клетках репрессированного в процессе онтогенеза аутосомного гомолога гена дистрофина – гена утрофина (*UTRN*,6q24). Известно, что в эмбриогенезе человека приблизительно до семи недель развития дистрофин не экспрессируется, и его функцию в мышцах выполняет белок утрофин. Между 7-й и 19-й неделями развития экспрессируются оба белка, после чего происходит замещение мышечного утрофина на дистрофин. Эти белки похожи своими N- и C- концевыми доменами, играющими решающую роль в функции дистрофина, тогда как функционально малозначимый центральный *rod domain* присутствует в утрофине в сильно укороченном виде.

Если достичь дерепрессии гена утрофина у больных мышечной дистрофией, то продукт его экспрессии белок утрофин мог бы компенсировать недостаток дистрофина в мышцах. В настоящее время получены данные, свидетельствующие о том, что *in vivo* трансфекция *mdx* мышцей геном утрофина приводит к экспрессии этого белка в скелетных мышцах и диафрагме. Эти результаты указывают на принципиальную возможность коррекции недостатка дистрофина в мышечных волокнах с помощью утрофина.

Таким образом, генная терапия имеет хорошие перспективы для лечения широкого спектра заболеваний, в том числе и мышечных дистрофий. Однако ее эффективность в настоящее время находится на достаточно низком уровне. При этом, основной проблемой генной терапии является проблема доставки определенного гена в нужную клетку. Можно надеяться, что решить эту проблему помогут исследования, направленные на использование клеток человека в качестве «переносчика» необходимых стволовых/прогениторных генов. Следует полагать, что успехи в изучении СК позволят выйти технологиям генной терапии на новый уровень, который обеспечит качественный скачок в лечении многих наследственных заболеваний человека, в том числе и мышечных дистрофий (Сукач А.Н.,2006).

2.14. Генная терапия серповидно-клеточной анемии

Явление РНК-интерференции (*RNA interference*) открыто в ходе экспериментов по подавлению экспрессии генов при помощи антисмысловой РНК у *C. elegans*. Термин «РНК-интерференция» (*iRNA*) для феномена специфического подавления экспрессии генов при введении двухцепочечной РНК был предложен Andrew Fire в 1998 году. РНК-интерференция предполагает специфическое нарушение экспрессии только тех генов,

которые обладают достаточно большой степенью гомологии с введенной двухцепочечной РНК.

РНК-интерференция широко изучается с терапевтической целью, например, для подавления экспрессии вирусных генов, онкогенов или специфических генов, вызывающих заболевания (Jiang M. et al., 2004). Достоинства этого метода: высокая специфичность (подавляется экспрессия только того гена, нуклеотидная последовательность которого полностью соответствует нуклеотидной последовательности вводимой двухцепочечной РНК); высокая эффективность (экспрессия гена подавляется более чем на 90%, несколько десятков молекул двунитовой РНК могут привести к деградации нескольких тысяч молекул РНК-мишени) (Берсенев А.В., 2006д).

Пока терапевтическое использование РНК-интерференции ограничено, во-первых, жесткими условиями выбора гена, работу которого надо подавить, во-вторых, индукцией ответа иммунной системы на экзогенную РНК, которая может привести к полному подавлению синтеза белка и апоптозу. Регуляция синтеза siRNA в определенное время и в определенных клетках позволит минимизировать возможное повреждающее действие РНК-интерференции. Применение РНК-интерференции в клеточной терапии требует точного, высокоспецифичного определения гена, играющего главную роль в развитии заболевания, так как РНК-интерференция заставляет этот ген «замолчать».

На первом этапе эксперимента в интрон γ -глобинового гена закодировали шпильку РНК (small hairpin RNA – shRNA), которая позволяет построить малые интерферирующие РНК (small interfering RNA – siRNA), комплементарные гену-мишени. Совместная экспрессия гена и siRNA позволяет специфически подавлять уровень транскриптов гена-мишени для siRNA строго в определенных клетках и на определенной стадии. Положение shRNA в интроне позволяет достигнуть синхронного уровня экспрессии экзогена и siRNA (Берсенев А.В., 2006д).

Предполагалось, что трансфекция гемопоэтических стволовых клеток с мутацией $p>3s$, являющейся причиной развития серповидно-клеточной анемии, должна привести к транскрипции γ -глобина с одновременной редукцией экспрессии ρs -глобина – белка, ответственного за возникновение этой болезни.

Для исследования возможности использования этого метода в терапии ученые выбрали гены, экспрессирующиеся в клетках эритролейкемии крысы (murine erythroleukemia – *Mel*): green fluorescent protein (*GFP*) и murine ρ -major (*Mr*). Клетки *Mel* были трансфецированы конструкцией с γ -глобином и shRNA, а затем подвергнуты дифференцировке для запуска эндогенной экспрессии глобина.

В клетках, трансфецированных вектором, имеющим shRNA, комплементарную *Mr*, содержание транскриптов этого гена снизилось на 86% уже на шестой день после трансфекции. При трансфекции вектором с другой вставкой shRNA уровень транскрипции гена *Mr* не менялся, что

доказывает высокую специфичность подавления экспрессии. В случае трансфекции клеток, экспрессирующих GFP белок, вектором с комплементарной вставкой, уровень флуоресценции понижался на 85%. Это доказывает возможность избирательного, высокоспецифичного подавления экспрессии генов в определенное время. Также были показаны различия этого подавления в зависимости от положения вставки shRNA внутри интрона (Берсенев А.В., 2006д).

Известно, что введение экзогенной РНК вызывает иммунный ответ, а именно активацию системы интерферона. Авторы изучили иммунный ответ на трансфекцию созданной ими конструкции, а именно проанализировали уровень транскрипции генов, вовлеченных в систему интерферона. Выяснилось, что экспрессия этих генов увеличивается вместе с увеличением экспрессии вектора клонирования. Однако, при уменьшении размера транскрибируемой вставки, а также при некоторых положениях вставки shRNA, этот эффект уменьшается. Эти результаты можно учесть при применении РНК-интерференции *in vivo*.

Серповидноклеточная анемия (СКА) – аутомное рецессивное заболевание, причиной которого является мутация в гене р-глобина, однонуклеотидная замена урацила на аденин, в результате чего синтезируется цепь молекулы глобина с глутамином, вместо валина. Замена одной аминокислоты оказывается достаточной, чтобы изменить функциональные свойства гемоглобина (пониженная растворимость, повышенная полимеризация). При этом гемоглобин уже не может выполнять кислородакцепторную функцию и кристаллизуется при недостатке кислорода, а эритроциты приобретают серповидную форму, склеиваются, тромбируют капилляры. Заболевание проявляется в первые несколько месяцев жизни, поскольку человеческий фетальный гемоглобин (HbF) обладает сильными «анти-серповидными» свойствами. Около 300 000 человек по всему миру страдают серповидно-клеточной анемией и умирают в детском возрасте (Берсенев А.В., 2006д).

Ученые из Sloan-Kettering Institute (New York, NY, USA) впервые показали возможность использования РНК-интерференции вместе с трансгенезом при лечении серповидно-клеточной анемии (Sun Y.L. et al., 2006). Мутантный ген получил название Ps, в отличие от нормального Р-глобина. Они трансфицировали человеческие гемопоэтические стовые клетки (CD34⁽⁺⁾) от здоровых людей (генотип P/P) и от пациентов – гомо-(Ps/Ps) и гетерозигот (P/Ps) с серповидно-клеточной анемией. После дифференцировки этих клеток, индуцированной эритропоэтином, подтвердилось строго специфичное снижение уровня транскриптов Ps, тогда как уровень Р-глобина существенно не снизился. В то же время можно было детектировать транскрипцию гена γ-глобина на сравнительно высоком уровне. Эти результаты показывают, что в клетках синхронно один транскрипт (Ps) заменяется другим (γ-глобин), за счет чего и достигается терапевтический эффект, так как фетальный γ-глобин снижает уровень

полимеризации Ps-глобина в эритроцитах. Важным достоинством метода является возможность использования собственных клеток пациента вместо донорского материала (Берсенев А.В., 2006д).

Таким образом, авторы показали осуществимость комбинированного терапевтического подхода генной и siRNA терапии на модели серповидно-клеточной анемии с клетками человека. Терапевтические возможности РНК интерференции потенциально очень велики, несмотря на риск иммунного ответа и необходимость строгих условий выбора гена-мишени. В настоящее время ведутся работы по изучению транспорта РНК из клетки в клетку (May R.C. et al., 2005), опубликованы статьи об исследованиях РНК-интерференции в борьбе со СПИДом (Cullen B.R., 2005; Delgado R. et al., 2005; Huelsmann P.M. et al., 2006), гепатитом (Wu Y. et al., 2005 Ying R.S. et al., 2006) и раком (Charames G.S. et al., 2006; Pai S.I. et al., 2006; Sun Y.L. et al., 2006). Все это дает надежду на разработку нового, более эффективного метода (чем обычная генная или клеточная терапия) в биомедицине. Тем не менее, метод может иметь ряд недостатков – нарушение естественного хода трансляции, иммунный ответ, неспецифическое подавление экспрессии (Rutz S. et al., 2004; Shimamoto A., 2005). Несомненно, развитие этого перспективного метода поможет решить некоторые из указанных проблем (Лопатина Т.В., 2006б).

В модели сингенной трансплантации костного мозга у мышей показано, что серповидно-клеточную анемию можно лечить методом генной коррекции, трансфицируя гемопоэтические стволовые клетки геном нормального глобина (Pawliuk R. et al., 2001; Puthenveetil G. et al., 2004). Выявлена возможность полной генетической коррекции серповидно-клеточной анемии методом рекомбинации эмбриональных стволовых клеток. Авторы исследования применили метод генетической коррекции ЭСК, описанный Rideout (Rideout W.V. et al., 2002).

Создана линия трансгенных мышей, ген глобина у которых был заменен на мутантный человеческий, обуславливающий возникновение серповидно-клеточной анемии. В течение недели после рождения мутантные мыши продолжали синтезировать HbF, однако затем происходило переключение на HbS и наблюдались тяжелые проявления заболевания. Такая модель позволила в точности копировать серповидно-клеточную анемию человека, включая тяжелые признаки поражения со стороны внутренних органов (спленомегалия, очаговые некрозы печени, нефропатия).

Из эмбрионов мутантных мышей с моделью человеческой серповидно-клеточной анемии выделены эмбриональные стволовые клетки и подвергнуты лечебной замене генов *in vitro*. Дефектный ген β -глобина (PS) человека был заменен на нормальную копию гена (PA) в ЭСК. Эффективность замены мутантного гена нормальным составила 14,2% (16 колоний ЭСК из 113). Затем проводили селекцию трансфицированных колоний ЭСК, несущих здоровый ген. После чего «пролеченные» ЭСК пересаживали в бластоцисты. Рожденные химерные самцы скрещивались с

самками-гомозиготами по гену нормального глобина человека и гетерозиготами по мутантному гену СКА. Все потомство от таких пар было здоровым. Полная коррекция серповидно-клеточной анемии была подтверждена генотипированием (выявлением замены на нормальный ген) и обнаружением эритроцитов нормальной формы (в отличие от контролей) в кровотоке мышей, полученных от родителей с коррекцией СКА (Берсенев А.В., 2006д).

Следовательно, гемопоэтические стволовые клетки, образующиеся из ЭСК, подвергшиеся гомологичной рекомбинации, в процессе эмбриогенеза давали начало нормальным эритроцитам, что привело к излечению анемии и связанной с ней патологии внутренних органов (в отличие от контрольных животных). Возможно, применение подобной методики у пациентов с серповидно-клеточной анемией также может привести к коррекции заболевания. Показана осуществимость такого подхода в модели наследственного иммунодефицита у нокаутных Rag-/-мышей.

Таким образом, базируясь на результатах приведенных работ можно предположить, что в будущем возможно создание индивидуальных нормальных гемопоэтических клеток у пациентов с моногенными наследственными дефектами. Такие клетки можно выделить из ЭСК, подвергшихся замене дефектного гена на нормальный в культуре и, в свою очередь, полученных методом переноса ядра клетки-донора самого пациента. Если данный подход будет реализован, то это даст шанс на излечение таких болезней, как серповидно-клеточная анемия после трансплантации собственных нормальных гемопоэтических стволовых клеток на фоне тотальной миелоабляции. В целом, технология направленного мутагенеза соматических клеток через рекомбинацию и селекцию ЭСК открывает широкие перспективы в изучении и лечении наследственных генетически обусловленных заболеваний (Берсенев А.В., 2006д).

2.15. Генная терапия пациентов, инфицированных ВИЧ

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) проникает в Т-хелперы, связываясь сначала с рецептором CD4, а затем с одним из хемокиновых рецепторов – CCR5 или CXCR4. Люди, гомозиготные по аллелю с делецией 32-bp (так называемая делеция delta32/delta32) гена CCR5, имеют рецептор CCR5 с нарушенной конформацией и обладают естественной резистентностью к инфицированию ВИЧ-1. Логично предположить, что трансплантация гемопоэтических клеток с delta32/delta32-генотипом пациенту, инфицированному ВИЧ, способна привести если не к полному излечению, то, по крайней мере, к стойкому восстановлению иммунного статуса за счет появления в организме невосприимчивых к ВИЧ Т-лимфоцитов. Тем не менее, подобных трансплантаций до настоящего времени практически не проводилось (Ayash L.J. et al., 2007), а трансплантации гемопоэтических стволовых клеток пациентам с ВИЧ без

учета генотипа рецептора CCR5 не приводили к изменению состояния больных.

В 2009 году в журнале *The New England Journal of Medicine* опубликовано сообщение группы G. Huetter об аналогичной трансплантации ГСК с аллелями delta32/delta32 пациенту с ВИЧ. Помимо ВИЧ у 40-летнего пациента был диагностирован острый миелобластный лейкоз. Пациент проходил курс HAART-терапии (highly active antiretroviral therapy), которая включает сильнодействующие противовирусные препараты и зачастую имеет серьезные побочные эффекты (Taylor B.S. et al., 2008). Последние могут привести к развитию у вируса лекарственной устойчивости. На фоне противовирусной терапии РНК ВИЧ в периферической крови пациента не обнаруживалась. Однако в связи с токсическими эффектами химиотерапии протокол HAART пришлось приостановить, в результате чего содержание РНК вируса в крови возросло до $6,9 \times 10^6$ копий/мл.

После курса миелоаблативной химиотерапии пациенту проведена трансплантация CD34⁽⁺⁾-клеток от неродственного HLA-совместимого донора, гомозиготного по аллелю гена CCR5 delta32/delta32. Количество трансфузированных ГСК составило $2,3 \times 10^6$ клеток/кг (Schmid C. et al., 2002). Через 13 суток у пациента отмечено приживление трансплантата и восстановление показателей крови до нормы. Однако спустя 11 месяцев диагностирован рецидив острого миелобластного лейкоза, и количество донорских клеток в крови снизилось до 15%. После этого провели повторный курс химиотерапии и радиотерапии с миелоаблацией, а также трансплантацию ГСК от того же донора. Количество клеток составило $2,1 \times 10^6$ клеток/кг. Вторая процедура привела к ремиссии, которая продолжалась в течение 20 месяцев (Григорян А.С., 2009д).

После трансплантации в периферической крови пациента перестали определяться антитела к полимеразе и к белкам капсида ВИЧ-1, хотя антитела к вирусным гликопротеинам gp120 и гликопротеинам gp41 продолжали выявляться. Тем не менее, исследование с помощью полимеразной цепной реакции не выявило в крови РНК ВИЧ-1. Также исследовали биоптаты слизистой оболочки прямой кишки, полученные на 5-ом месяце после трансфузии. CD4⁽⁺⁾-лимфоциты слизистой оболочки кишечника несли на плазмолемме дефектный рецептор CCR5, не способный связывать вирус. Нормальный рецептор CCR5 сохранялся на макрофагах. Однако следует заметить, что некоторые макрофаги являются долгоживущими клетками, которые могут оставаться резервуаром инфекции в течение длительного времени.

Авторы работы не выявили ухудшения состояния пациента в течение всего срока наблюдения, а также появления в организме детектируемой РНК вируса. Это более чем обнадеживающий результат, однако, приходится констатировать тот факт, что практика подобных трансплантаций вряд ли может стать рутинным клиническим методом.

Подбор HLA-совместимого донора – непростая процедура, которая в данном случае дополнительно усложняется поиском донора, гомозиготного по аллелю гена *CCR5 delta32/delta32*. Авторы работы указывают, что из 62 совместимых доноров, зарегистрированных в Немецком центре доноров костного мозга (German Bone Marrow Donor Center), только один оказался носителем искомой мутации. Помимо этого, сам вирус иммунодефицита не всегда использует для проникновения в клетку рецептор *CCR5*, и существует менее часто встречающийся тип вируса (X4), использующий в качестве корецептора молекулу *CXCR4*. Более того, обычно в крови пациентов с ВИЧ одновременно обнаруживаются разные штаммы вирусов (Skrabal K. et al., 2007). В данном случае у пациента в сыворотке крови выявлены следовые количества РНК ВИЧ-1 типа X4, однако они, по-видимому, не повлияли на исход лечения, и пациент смог отказаться от высокотоксичной HAART-терапии (Григорян А.С., 2009д).

Помимо единичных попыток трансплантации ГСК с целью восстановления нормального лимфопоэза, в настоящее время проводятся полноценные клинические исследования, основанные на том же принципе – создание в организме пациента пула невосприимчивых к ВИЧ-1 Т-лимфоцитов.

Опубликованы результаты II фазы клинических испытаний трансплантации генетически модифицированных аутогенных ГСК пациентам с ВИЧ. Данная работа проведена группой R.T. Mitsuyasu (2009) и является первым рандомизированным, двойным слепым, плацебо–контролируемым клиническим исследованием, в которое были включены 74 пациента (38 пациентов исследуемой основной и 36 пациентов контрольной групп). У пациентов основной группы после курса терапии HAART проводилась мобилизация ГСК из костного мозга, после чего $CD34^{(+)}$ -клетки были собраны из периферической крови и трансдуцированы геном рибозима OZ1, специфически расщепляющего РНК ВИЧ. Затем выполнено обратное введение клеток в кровотоки. Пациенты из контрольной группы получили трансфузию аутогенных $CD34^{(+)}$ -клеток, не трансдуцированных геном рибозима.

Показано, что OZ1 ингибирует репликацию ВИЧ-1 *in vitro*, причем при длительном культивировании у вируса не развивается резистентность к его действию (Fanning G. et al., 2003). В двух клинических испытаниях I фазы продемонстрировано, что трансплантация аутогенных ГСК либо $CD4^{(+)}$ -лимфоцитов, трансдуцированных геном OZ1, является безопасной процедурой (Macpherson J.L. et al., 2005; Amado R.G. et al., 2004). После трансплантации у пациентов не наблюдалось негативных побочных эффектов как в раннем, так и в позднем посттрансплантационном периоде. Авторы клинического исследования предположили, что собственные ГСК, трансдуцированные геном OZ1, дают начало популяциям миелоидных и лимфоидных клеток, в которых вирус не может реплицироваться (Григорян А.С., 2009д).

Доля CD34⁽⁺⁾-клеток, трансдуцированных геном OZ1, составила 54% от общего количества трансплантированных пациентам из исследуемой группы ГСК. После трансплантации пациентов наблюдали в течение 46 месяцев, оценивая присутствие в их периферической крови провирусной ДНК ВИЧ, активной РНК-формы рибозима OZ1, абсолютное количество CD4⁽⁺⁾-лимфоцитов в крови, а также функцию тимуса (TREC-ВИЧ-1 анализ).

Спустя 1 месяц после трансплантации у 94% пациентов исследуемой группы в крови обнаруживалась ДНК OZ1, однако со временем этот показатель уменьшился (до 7% через 3 месяца). Через 1,5 месяца у этих пациентов отмечалось статистически недостоверное снижение титра вируса в крови в сравнении с пациентами из контрольной группы. Также была отмечена слабая корреляция между снижением количества РНК-копий ВИЧ-1 в крови и дозой трансплантированных клеток, и, хотя данные оказались статистически недостоверны, подобной корреляции в контрольной группе не обнаружено.

На 3-м месяце наблюдения различия между контрольной и основной группами стали статистически значимыми. У пациентов, получивших инфузию OZ1-трансдуцированных клеток, количество РНК-копий вируса в крови оказалось существенно меньше, чем у пациентов, получивших инфузию нетрансдуцированных ГСК. После трансплантации к 3-му месяцу 45% пациентов (17 человек) из исследуемой группы были вынуждены возобновить терапию HAART. В контрольной группе этот показатель оказался выше – 61% (22 человека). Пациенты из исследуемой группы вернулись к приему противоретровирусных препаратов через 15 месяцев, пациенты контрольной группы – через 7,5 месяца. Также абсолютное количество CD4⁽⁺⁾-лимфоцитов в 1 мкл крови у пациентов из OZ1- группы к 3 месяцу превысило показатель содержания лимфоцитов у пациентов из группы контроля и составило 490 и 441 клеток, соответственно (у здорового человека этот показатель колебался в пределах от 500 до 1600 клеток в 1 мкл).

Низкая эффективность метода, очевидно, связана с тем, что перед трансплантацией пациентам не проводилась миелоаблативная химиотерапия, и в результате в организме постоянно присутствовали клетки, служившие резервуаром инфекции. При этом не происходило замещение инфицированных клеток OZ1-продуцирующими, поскольку ГСК, не экспрессирующие OZ1, оставались в костном мозге, и их процент, в сравнении с долей трансдуцированных ГСК, оставался высоким. В то же время о применении химиотерапии на фоне противоретровирусной терапии говорить сложно, поскольку это может повлечь за собой тяжелые побочные эффекты, угрожающие жизни пациента. Тем не менее, данное клиническое исследование показывает перспективность применения генной терапии для лечения пациентов с ВИЧ, а его результаты указывают на необходимость совершенствования рассматриваемого метода, что также подтверждается

положительными результатами, о которых сообщает группа G. Huetter (Григорян А.С., 2009д).

2.16. Генная терапия муковисцидоза

Муковисцидоз (МВ) – распространённое (среди представителей европейской расы) аутосомно–рецессивное наследственное заболевание, возникающее в результате мутации гена *CFTR* (transmembrane conductance regulator), регулирующего транспорт иона хлора через мембрану эпителиальной клетки. При этом усиливается абсорбция натрия и воды, и происходит «высушивание» слизи, продуцируемой экзокринными железами. Избыточно вязкий секрет закупоривает протоки, вследствие чего образуются множественные кисты и развивается системная дисфункция экзокринных желёз. Муковисцидоз является актуальным в структуре заболеваемости и смертности, основной причиной которой является прогрессирующая дыхательная недостаточность и присоединение инфекций, среди детей и подростков (Берсенева А.В., 2005а).

За последние несколько лет предложено несколько протоколов генотерапии муковисцидоза, использующей генетические конструкции *CFTR* (Ferrari S. et al., 2002; Griesenbach U. et al., 2004). Оптимальной терапевтической мишенью для доставки вектора с *CFTR* считается дыхательный эпителий (ДЭ, многорядный реснитчатый эпителий, выстилающий воздухоносные пути), однако его трансфекции *in vivo* препятствуют избыток слизи, отсутствие рецептора для вируса на поверхности клетки, быстрая деградация ДНК и плохая интеграция вектора (Ferrari S. et al., 2002; Griesenbach U. et al., 2004). Предложен альтернативный подход к заместительной клеточной генотерапии, который заключается в применении аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга, трансфицированных конструкцией *CFTR*, как потенциального источника нового (здорового) ДЭ. Подоплёкой к применению мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток для терапии муковисцидоза послужили следующие данные:

- указания на возможность дифференцировки (или слияния) ММСК в эпителиальные клетки дыхательных путей *in vitro* и *in vivo* (Kotton D.N. et al., 2001; Spees J.L. et al., 2003);
- хорошая миграция ММСК в дефектные лёгкие *in vivo* (Kotton D.N. et al., 2001; Ortiz L.A., 2003);
- хорошая трансфицируемость ММСК различными генетическими конструкциями с уверенной экспрессией трансгена (Zhang X.Y. et al., 2002);
- возможность использования аутологичного материала и экспансия МСК *in vitro* в миллиард раз за 2 месяца культивирования (Sekiya I. et al., 2002).

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки забирали из крыла подвздошной кости от здоровых волонтеров и от больных

муковисцидозом. Клетки выделяли и культивировали по протоколу Sekiya-Prokop (Sekiya I. et al., 2002) с масштабированием в системе клеточной фабрики (Nunc). Клетки модифицировали меткой GFP и трансгеном *CFTR* с последующей лекарственной селекцией. Для дифференцировки ММСК применяли специальную систему кокультивирования с линией дефектного (по *CFTR*) ДЭ или с первичными клетками, выделенными из лёгких больных муковисцидозом. Клетки кокультивировали на границе раздела жидкой и газовой (воздушной) фаз. Через 2 (и более) недель кокультивирования нормальных МСК и дефектных клеток ДЭ в такой системе наблюдали появление эпителио-подобных клеток, несущих метку мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Кроме того, часть GFP⁽⁺⁾ (МСК) клеток положительно окрашивалась на эпителиальные маркёры – СК-18 и occludin (~ 10% ММСК), чего не наблюдалось в контрольных экспериментах (культивирование ММСК в сходных условиях) (Берсенев А.В., 2005а).

После кокультивирования наблюдали экспрессию *CFTR* дикого типа, которая была подтверждена методом RT-PCR отсортированных (FACS) GFP⁽⁺⁾-клеток. Это означает, что часть мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток от здоровых доноров при кокультивировании подвергалась трансдифференцировке в клетки ДЭ. Феномен слияния исключали отсутствием клеток, положительно окрашивающихся одновременно как по метке ММСК-GFP, так и по метке ДЭ-RFP.

Для оценки клинического потенциала метода выделяли мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки от МВ-гомозигот. Клетки больных муковисцидозом имели одинаковую со здоровыми способность к экспансии *in vitro* и дифференцировке в ткани мезенхимального происхождения – костную и жировую. Дефектные мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки трансфицировали *CFTR*. Генетическая коррекция ММСК не влияла на их способность к делению, образованию колоний и к дифференцировке (по сравнению клетками до трансфекции и нормальными мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками от здоровых доноров). Устойчивость экспрессии *CFTR* подтверждали методом RT-PCR. При кокультивировании дефектных, трансфицированных *CFTR* ММСК (от больных МВ) с дефектной линией ДЭ через 1 месяц наблюдали восстановление секреции аниона хлора (по радиоактивной метке). Как и в физиологических условиях, хлор секретировался с апикальной части мембраны клеток в ответ на стимуляцию с АМР. Секреция хлора не зависела от количества мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (5, 10 или 20 %) при кокультивировании с дефектными клетками ДЭ. Оптимальное соотношение кокультуры составило 1:5 (20% ММСК).

Тем самым, предложен новый метод клеточно-генетической коррекции функции ДЭ у больных муковисцидозом. Исследование, проведенное на материале пациентов с муковисцидозом, продемонстрировало возможность использования аутологичных генмодифицированных (или

немодифицированных) мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в клинической практике. Однако до начала клинических испытаний необходимо подтвердить эффективность метода на животных моделях (Берсенев А.В., 2005а).

Анализ результатов генной терапии позволяет прийти к следующим основным выводам.

1. Генная терапия пригодна для лечения широкого спектра заболеваний.

2. Генная терапия в применяемом объеме имеет низкий риск осложнений.

3. Эффективность генной терапии пока оставляет желать лучшего.

До сих пор практически ни в одном проекте не удалось получить успешной трансформации (трансдукции) достаточно большого числа клеток-мишеней и добиться терапевтически значимой длительности экспрессии чужеродного гена (Баранов В.С., Баранов А.Н., 2000). Данное направление требует дальнейшего развития.

Глава 3. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК

Выращиваемые на искусственных питательных средах клетки и ткани растений составляют основу разнообразных технологий в сельском хозяйстве. Одни из них направлены на получение идентичных исходной форме растений (оздоровление и клональное микроразмножение на основе меристемных культур, создание искусственных семян, криосохранение генофонда при глубоком замораживании меристем и клеток пыльцы), другие – на создание растений, генетически отличных от исходных, путем облегчения и ускорения традиционного селекционного процесса или создания генетического разнообразия, поиска и отбора генотипов с ценными признаками.

В первом технологическом варианте используют искусственное оплодотворение, культуру незрелых гибридных семян и зародышей, регенерацию растений из тканей летальных гибридов, а также гаплоидные растения, полученные при культивировании пыльников или микроспор. Во втором – новые формы растений создаются на основе трансгенных растений и мутантов, образующихся *in vitro*. Таким путем получены растения, устойчивые к вирусам и другим патогенам, гербицидам; растения, способные синтезировать токсины, патогенные для насекомых-вредителей; растения с чужеродными генами, контролирующими синтез белков холодоустойчивости и белков с улучшенным аминокислотным составом; растения с измененным балансом фитогормонов.

Следует обратить внимание на то, что линии ЭСК человека и эмбриональные герминативные клеточные линии G₁ из полового бугорка 12,5-дневного эмбриона мышей BALB/c, поддерживаемые *in vitro* длительное время (15-75 пассажей), подвержены генетическим и эпигенетическим изменениям, которые, очевидно, обусловлены адаптацией клеток к росту в культуральных условиях в недифференцированном состоянии, а значит, нуждаются в тщательном геномном мониторинге как во время культивирования, так и в детальном анализе при использовании *in vivo* и в клинических целях. Применение линий ЭСК для модельных фармакологических экспериментов, преclinical и клинических испытаний в будущем предполагает использование для этих целей клеток, прошедших минимальное количество пассажей в культуре (Мелихова В.С., 2005).

3.1. Культивирование стромальных клеток костного мозга крысы на коллагене I типа разного происхождения

Коллаген является фибриллярным белком, одним из компонентов межклеточного матрикса. В настоящее время известно 27 различных генетических типов коллагена, из них 4 фибриллообразующих, на которые

приходится 95% общего количества коллагенов в организме (Ruggiero F. et al., 2005). Белками, обеспечивающими механическую прочность всех тканей млекопитающих, являются фибриллообразующие коллагены типов I, II, III и V, из которых 90% приходится на коллаген типа I. Благодаря своему уникальному и очень консервативному аминокислотному составу, коллаген мало иммуногенен и поэтому при введении под кожу практически не вызывает иммунного ответа. Кроме того, коллаген является отличным гемостатиком. Все это делает коллаген материалом, широко применяемым в медицине и биотехнологии. Уникальность коллагенового геля в качестве субстрата заключается в том, что структура молекулы фибриллярного коллагена настолько приспособлена к его фибриллообразующей функции, что раствор коллагена дает нативную фибриллу спонтанно *in vitro* при приведении системы к физиологическим условиям.

Препараты коллагена получают из шкур овцы или молодых быков методом щелочно-солевой экстракции. Способность коллагена к фибриллообразованию зависит от способа получения коллагена. Существуют три основных способа получения коллагена I типа: кислотная, ферментативная и щелочно-солевая экстракции. Все они дают нативную, то есть трехспиральную молекулу белка.

Коллаген I типа широко применяется в медицине и биотехнологии в связи с относительной простотой получения и своими биологическими свойствами. На различных молекулярных и фибриллярных коллагеновых субстратах на плоскости и при трехмерном культивировании в гелях коллагена изучается пролиферация (индекс пролиферации), распластывание (актиновый цитоскелет, площадь распластывания) и остеогенная дифференцировка (наличие внутриклеточной щелочной фосфатазы) стромальных клеток костного мозга для применения в заместительной клеточной терапии в качестве носителя стромальных стволовых клеток.

В настоящее время препараты коллагена I типа и его различные комбинации с другими остеотропными препаратами активно используются при костной пластике в травматологии и ортопедии, челюстно-лицевой хирургии и стоматологии (Friedmann A. et al., 2002; Wahl D.A. et al., 2002).

В последние десятилетия интенсивно развивается новое направление биотехнологии – тканевая инженерия, то есть создание из клеток и матрикса композиций, предназначенных для восстановления тканей. Началом этого направления служит работа Е. Белла с сотрудниками по включению в коллагеновый гель дермальных фибробластов, которые живут, размножаются и перестраивают структуру геля. В дальнейшем на основе коллагенового геля были получены эквиваленты практически всех тканей организма.

Коллаген используют также при двухмерном культивировании клеток в качестве субстрата. В этом случае возможно использование как фибриллярного, так и молекулярного коллагена. При этом поведение клеток на этих разновидностях коллагенового субстрата значительно различается. В частности, от структуры нанесенного на подложку коллагена зависят форма

и организация актинового цитоскелета у культивируемых фибробластов (Бармашева. А. А. и др., 2009; Sato K. et al., 2003).

3.2. 3D-культивирование: от отдельных клеток к регенерационной ткани

Феномену эпителио-мезенхимальной пластичности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, наблюдаемому в 2D культурах, до сих пор не найдено удовлетворительного объяснения. Новые возможности открывает 3D культивирование ММСК, которое моделирует закономерности образования слоев эпителиальных клеток (ламинацию). Анализ литературных данных позволяет предположить, что именно спонтанное формирование ММСК-сфероидов индуцирует образование регенерационной («бластемной») ткани в фетальных и взрослых органах при повреждении. Существует возможность репрограммирования плотных сфероидов ММСК в нейроэктодерму и примитивную энтодерму (Репин В.С. и др., 2008; Сабурин И.Н. и др., 2009, 2010).

3.3. Хромосомные aberrации, возникающие в эмбриональных стволовых клетках человека в процессе культивирования

При культивировании эмбриональных стволовых клеток человека необходимо проводить постоянный мониторинг их кариотипа, поскольку в процессе культивирования *in vitro* в ЭСК нередко возникают хромосомные aberrации (Прохорович М.А. и др., 2007; Draper J. et al., 2004; Inzunza J. et al., 2004; Maitra A. et al., 2005; Baker D.E. et al., 2007; Josephson R., 2007), такие как анеуплоидии – потери или, напротив, приобретения лишних хромосом в диплоидном хромосомном наборе, и структурные перестройки. Подобные изменения генома клетки могут влиять на ее пролиферацию как в сторону усиления, так и подавления, на способность к спонтанной дифференцировке в том или ином направлении, а также приводить к злокачественной трансформации. По этой причине изменения кариотипа ЭСК снижают воспроизводимость и достоверность результатов научных экспериментов вследствие многочисленных артефактов, которые являются серьезным препятствием для применения ЭСК в клинической практике (Josephson R., 2007). К настоящему времени известно о возникновении таких хромосомных аномалий при культивировании ЭСК, как появление в геноме лишних 12, 17 и X хромосом (Josephson R. et al., 2006; Baker D.E. et al., 2007).

В декабре 2008 года в журнале *Nature Biotechnology* появились две работы независимых групп исследователей, где показано, что набор хромосомных aberrаций, происходящих в ЭСК человека при культивировании, несколько шире уже известного. При этом исследователи не стали ограничиваться общепринятой окраской препаратов метафазных

пластинок по Гимза, применяющейся для учета хромосомных aberrаций, поскольку этот метод не обладает достаточной точностью. Помимо стандартного метода использовали анализ единичных нуклеотидных полиморфизмов (SNP – анализ от single nucleotide polymorphysm), основанный на микрочиповой технологии (Maitra A. et al., 2005), провели сравнительную геномную гибридизацию. Результаты подтверждены флуоресцентной гибридизацией *in situ* (FISH). Также оценивалось влияние хромосомных aberrаций на экспрессию генома с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (qRT-PCR) (Григорян А.С., 2009в).

Научная группа С. Spits охарактеризовала семнадцать линий эмбриональных стволовых клеток человека, полученных в собственной лаборатории по известной методике (Mateizel I. et al., 2006) и культивированных различное число пассажей. Наименьшее число пассажей, на котором осуществлен анализ, – 5, наибольшее – 276.

В культивировавшихся линиях выявлено три типа хромосомных аномалий: трисомии либо моносомии по хромосомам 22, 18 и 17 (только в одной линии) (1); субмикроскопические дубликации (дубликации участков хромосом, не выявляемые окраской по Гимза) (2); появление в клетках гибридной хромосомы, включающей короткое плечо хромосомы 18, ее центромерный участок и длинное плечо хромосомы 5 либо 7 (Maitra A. et al., 2005).

Наиболее часто среди встретившихся субмикроскопических дубликаций, выявившихся в пяти линиях эмбриональных стволовых клеток после длительного культивирования (более чем 100 пассажей), отмечалась дубликация локуса 20q11.21. Эта аномалия прежде была описана для двух линий эмбриональных стволовых клеток – H7 и HSF1, однако ей не придавали большого значения, считая данную аномалию характерной только для конкретных клеточных линий (Maitra A. et al., 2005; Wua H. et al., 2008). Группа С. Spits показала, что данная мутация имеет в разных случаях разную протяженность и может затрагивать ген *DNMT3B*, продукт которого участвует в пролиферации клеток и защищает ЭСК от апоптоза.

Увеличение количества белка DNMT3B в клетках с произошедшей дубликацией приводило к тому, что клетки начинали активнее пролиферировать, а также были в меньшей степени склонны к спонтанной дифференцировке, обычно наблюдающейся по краям колоний ЭСК. Другими генами, которые могли подвергаться дубликации, оказались известный регулятор самообновления ЭСК Sox-2 и протоонкоген c-Myc (Григорян А.С., 2009в).

Исследователи под руководством А.Л. Perrier сосредоточились на изучении дубликации локуса 20q11.21, включающей до 23 генов и микро-РНК hsa-miR-1825, проанализировав пять линий эмбриональных стволовых клеток человека. При этом кариотип клеток оценивался на каждом пассаже до пассажа, на котором впервые определялась данная аномалия. Для линий ЭСК, выбранных французскими учеными, ранее показан нормальный

диплоидный кариотип (по данным регистра эмбриональных стволовых клеток NIH) (<http://stemcells.nih.gov/research/registry>). Дубликации обнаружены в четырех линиях из пяти на пассажах от 50 до 105. То, что в одной линии аномалия так и не выявилась, исключает влияние на появление дубликации условий культивирования, принятых в данной лаборатории. В остальных четырех линиях ЭСК дубликации выявлены на соответствующих пассажах в 24-57% клетках. При этом клетки с дубликацией, как подчеркивают авторы работы, не отличались от нормальных клеток скоростью пролиферации и экспрессией характерных для ЭСК маркерных генов.

Известно, что амплификация локуса 20q11.21 наблюдается при карциномах молочной железы, раке легкого (Tonon G. et al., 2005), гепатоцеллюлярной карциноме (Midorikawa Y. et al., 2006), раке мочевого пузыря (Hurst C.D. et al., 2004), на ранних стадиях рака шейки матки (Scotto L. et al., 2008), а также при меланоме (Koynova D.K. et al., 2007). По-видимому, эта область генома содержит гены, регулирующие пролиферацию клеток, хотя группа N. Lefort и не обнаружила в эмбриональных стволовых клетках с ее дубликацией повышения пролиферативной активности. Также следует обратить особенное внимание на содержащуюся в регионе 20q11.21 микро-РНК, поскольку в настоящее время известно, что микро-РНК являются ключевыми регуляторами активности жизненно важных генов и задействованы в канцерогенезе (Calin G.A. et al., 2004).

Ученые из научной группы С. Spits предположили, что появление описанных субмикроскопических дубликаций и фрагмента хромосомы 18, соединенного с фрагментом 5 либо 7 хромосомы, обусловлено нарушением механизмов репарации ДНК. В хромосоме 18 часто возникает двунитевой разрыв в определенной области (fragile site – участок разрыва, ломкий сайт) и происходит потеря длинного плеча вместе с теломерным участком. Затем потерянный участок хромосомы восстанавливается, однако в качестве основы по какой-то причине используются хромосомы 5 либо 7. Такие нарушения могут быть индуцированы определенными условиями культивирования, например заменой фетальной бычьей сыворотки на искусственные аналоги сыворотки (Lukusa T. et al., 2008). Причина, по-видимому, состоит в том, что в искусственной сыворотке отсутствуют некоторые необходимые рибонуклеотиды, что приводит к нарушениям механизмов репарации ДНК. Относительно субмикроскопических дубликаций авторы свое предположение никак не поясняют.

Доказано, что помимо уже описанных изменений кариотипа для ЭСК человека характерно возникновение хромосомных аномалий, затрагивающих одновременно хромосомы 18, 5 и 7, а также дубликации области субсегмента 20q11.21, включающего гены, продукты которых участвуют в регуляции самообновления и дифференцировки эмбриональных стволовых клеток.

Наиболее частыми являются также структурные и числовые аномалии хромосом 12, 17, 20 и X-изохромосомы (i12p), изодисцентрики, транслокации,

трисомии 12, 17, 20 (Draper J. et al., 2004; Inzunza J. et al., 2004; Rosler E. et al., 2004). Интересно, что в ЭСК мыши также наблюдаются хромосомные aberrации, причем в них вовлекаются хромосомы или хромосомные регионы, ортологичные хромосомам человека. Так, изменения кариотипа эмбриональных стволовых клеток мыши, сопровождающиеся редукцией способности колонизировать зародышевую половую линию, часто затрагивают хромосомы 8 и 11. При этом хромосома 11 мыши имеет участок, синтенимый с длинным плечом хромосомы 17 человека. Действительно, последовательности генов *Stat3* и *Grb2*, контролирующие самовозобновление и дифференцировку ЭСК мыши, и расположенные на хромосоме 11, у человека локализованы в длинном плече хромосомы 17 (17q21.31 и 17q24-q25, соответственно).

Приведенные данные свидетельствуют в пользу гипотезы об адаптации ЭСК к длительным условиям культивирования через реорганизацию кариотипа и указывают на относительную универсальность молекулярных механизмов такой адаптации как у человека, так и у мыши. Кроме того, они диктуют необходимость более тщательного контроля характеристик эмбриональных стволовых клеток в культурах и применения более чувствительных методов детекции хромосомных aberrаций, нежели используемые сегодня. В то же время полученные результаты являются феноменологическими и не дают ответа на вопросы о причинах и механизмах возникновения хромосомных aberrаций в эмбриональных стволовых клетках, которые, несомненно, требуют дальнейшего изучения (Григорян А.С. 2009в).

3.4. Выделение и культивирование гемопоэтических стволовых клеток

В связи с поисками новых путей решения проблемы заместительной терапии с использованием стволовых клеток внимание биологов и клиницистов привлекла способность гемопоэтических стволовых клеток давать начало различным типам специализированных соматических клеток под влиянием ряда индуцирующих ростовых факторов, а также сохранять эту способность после длительной криоконсервации. Основным источником стволовых клеток является костный мозг, способный, в дополнение к своей основной гемопоэтической функции, генерировать предшественники клеточных элементов большого числа дифференцированных тканей организма. Однако их можно в различных количествах получить также из периферической и пуповинной крови (Гольдберг Е.Д. и др., 2006; Дыгай А.М., Жданов В.В., 2010; Дыгай А.М. и др., 2011).

Количество жизнеспособных клеток определяется путем окрашивания 1% раствором трипанового синего с последующим подсчетом неокрашенных клеток в камере Горяева. Выделения CD34⁽⁺⁾ и CD133⁽⁺⁾-клеток из

мононуклеарной фракции проводят с помощью иммуномагнитного сепаратора MiniMACS (Miltenyi Biotec).

Для культивирования выделенных ГСК используются питательные среды RPMI1640 (Sigma), L-15 (Sigma), DMEM/F12 (Sigma) и ПСП, содержащие 10% фетальной сыворотки плода коровы. Кроме того, ГСК культивируют в среде RPMI 1640, содержащей 10% фетальной сыворотки плода коровы с добавлением 1,00 нг/мл Flt-3 Ligand, 100 нг/мл Stem Cell Factor, 20 нг/мл IL-3, 20 нг/мл IL-6. Клетки высевают в культуральные 24 луночные плашки. Культивирование проводят при +37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Во время культивирования осуществляется ежедневное микроскопирование культуральных плашек с культурой клеток с помощью инвертированного микроскопа.

При культивировании CD34⁽⁺⁾ и CD133⁽⁺⁾ клеток на питательной среде RPMI 1640, содержащей 10% фетальной сыворотки плода коровы как с добавлением 100 нг/мл Flt-3 Ligand, 100 нг/мл Stem Cell Factor, 20 нг/мл IL-3, 20 нг/мл IL-6, так и без добавления, пролиферация клеток не отмечается. Культивирование ГСК из костного мозга человека на питательных средах L-15 (Sigma), DMEM/F12 (Sigma), ПСП, содержащих 10% фетальную сыворотку плода коровы без добавления цитокинов, в течение 3-х недель культивирования размножение не сопровождается размножением выделенных меченых клеток.. На ранних сроках культивирования наблюдается частичное прикрепление клеток на поверхности культуральной посуды, которые по морфологическим признакам подобны лимфоцитам и представляют собой относительно однородную совокупность округлых клеток. Часть клеток находится во взвешенном состоянии и сохраняет изначальную форму.

При культивировании немеченых ядродержащих клеток, полученных после магнитной сепарации при таких же условиях, как и при культивировании CD34⁽⁺⁾ и CD133⁽⁺⁾-клеток, на начальных этапах отмечается появление в культуральной среде групп взвешенных клеток, состоящих из нескольких десятков клеток, которые на 2-3-и сутки прикрепляются к культуральной поверхности. На 10-е сутки культивирования от центра к периферии этих колоний начинается рост фибробластоподобных клеток. Кроме того, к данному сроку культивирования в культуре отмечается появление крупных клеток с зернистой цитоплазмой, а также клеток с ундулирующей мембраной, характерных для макрофагальных клеток. По мере культивирования макрофаги исчезают, а на их месте начинают расти фибробластоподобные клетки. На 13-е сутки культивирования число фибробластных клеток в монослое начинает увеличиваться. Образование конфлюэнтного монослоя, состоящего из фибробластоподобных клеток удлиненной формы, начинается к 25-дневному сроку культивирования.

Выделение ядродержащих клеток из пуповинной и периферической крови, а также из костного мозга человека с применением Ficoll Raque и лизирующего раствора дает возможность получать максимально очищенные

мононуклеарные фракции. Использование иммуномагнитной сепарации позволяет выделять избирательно гемопоэтические стволовые клетки с фенотипами CD34⁽⁺⁾ и CD 133⁽⁺⁾ до 1% от общего количества мононуклеарных клеток. Применение питательной среды RPMI 1640 в комплексе с ростовыми факторами и цитокинами для культивирования CD34⁽⁺⁾ и CD133⁽⁺⁾-клеток не приводит к активации пролиферативных свойств указанных клеток (Наханов А.Х. и др., 2007).

3.5. Предварительная иммунокоррекция и культивирование клеток костного мозга

Известно, что хронические длительно протекающие заболевания (хронический стресс) сопровождаются ингибированием миграционной активности и нарушениями популяционного состава иммунорегуляторных клеток, в том числе клеток костного мозга. Ранее показано, что в связи с развитием хронической иммуносупрессии у таких больных снижена терапевтическая эффективность мононуклеарной фракции клеток (МФК) КМ при проведении клеточной терапии.

У кардиохирургических больных (n=20) изучали влияние предварительной иммунокорректирующей терапии и процесса культивирования мононуклеарной фракции клеток костного мозга на изменение функциональной (миграционной) активности и фенотипического состава аутологичных клеток костного мозга; исследовали фенотипический состав и функциональную активность МФК из крови и костного мозга, взятых одновременно, без и после подготовки иммунокорректирующими препаратами, а также МФК из костного мозга до и через 5 суток культивирования. Предварительную иммунокорректирующую терапию осуществляли у больных, если *in vitro* исходный индекс стимуляции МФК крови был <1 (ИС<1).

Исследование клеток крови и костного мозга проводили на проточном цитометре Cytomics FC-500 фирмы Becton Coulter с использованием моноклональных антител к CD4, CD8, В-кл, НК, Та, и CD4/CD8. Результаты цитофлюориметрического анализа обработаны статистически.

Выделив в исследуемой группе показатели, характеризующие морфогенетическое звено иммунитета (CD4, CD8), авторы установили, что у больных без иммунокорректирующей подготовки из костного мозга активно мигрируют в кровь не клетки, участвующие в морфогенетических процессах, а клетки, обеспечивающие реализацию общих иммунных реакций организма (В-кл, НК, Та). Подготовка больных иммунокорректорами тормозила выход в кровь В-кл, НК, Та из костного мозга, но стимулировала миграцию клеток, участвующих в процессах пролиферации и репаративной регенерации (CD4 и CD8). В процессе культивирования аутологичных МФК костного мозга от больных без иммунокоррекции в культуре снижалось содержание иммунорегуляторных популяций клеток (НК, В-кл и Та). Предварительная

иммунокорректирующая подготовка также снижала эти показатели у больных.

Таким образом, иммунологическая подготовка активизирует миграционную активность из костного мозга в кровь клеток, участвующих преимущественно в процессах пролиферации и репаративной регенерации (CD4, CD8, увеличивается отношение CD4/CD8). Культивирование МФК костного мозга от больных без предварительной иммунокоррекции снижает содержание в культуре клеток, не участвующих в репаративных и пролиферативных реакциях (B-кл, NK, T_H), но повышает содержание клеток регулирующих восстановительный морфогенез (CD4, CD8) в большей степени, чем у больных с иммунокоррекцией.

Более выраженная терапевтическая эффективность МФК костного мозга у больных после предварительного культивирования и иммунокоррекции по сравнению с больными, клетки которых только культивировались, обусловлена возвращением этих клеток в организм, где уже восстановлена интеграционная функция иммунного статуса, с помощью иммунокорректоров (Темнов А.А. и др., 2007).

3.6. Преимущество цитогенетических характеристик в пассажах эмбриональной герминативной клеточной линии мыши G1

Эмбриональные герминативные клетки (ЭГК) являются потомками примордиальных герминативных клеток. Эти клетки имеют общие характеристики плюрипотентности, к которым относятся неограниченная пролиферация, экспрессия ряда маркеров эмбриональных клеток, в частности, щелочной фосфатазы, Oct-4, а также способность дифференцироваться в производные всех трех зародышевых листков (Park J.H. et al., 2004). Считается, что кариотипическая эволюция таких эмбриональных клеток под влиянием условий культивирования может быть одной из причин снижения плюрипотентных свойств на более поздних пассажах.

В то же время, ранние события формирования линий эмбриональных клеток, специфика селекции клеточных клонов после прохождения «кризиса», типичного для адаптации клеток к новым условиям их культивирования *in vitro*, до сих пор остаются недостаточно исследованными в связи с ограниченностью количества клеток на этих пассажах. Важность изучения ранних событий обусловлена тем, что традиционно кариотипический анализ выполняется на преобладающих («модальных») клеточных клонах, успешно переживших такой «кризис», который не исключает присутствия «минорных» вариантов и изменений их соотношений в процессах пассирования клеток. Так, кариотипирование независимо полученных 88 ЭСК линий мышей показало, что «нормальный» кариотип, как модальный в большинстве клеток, обнаруживается только в 53 из них,

причем в 52 линиях состав половых хромосом был XY, а у одной линии – XX; все остальные эмбриональные стволовые клетки линий несли различные типы цитогенетических аномалий (Sugawara A. et al., 2006).

Для изучения преемственности кариотипических характеристик в разных пассажах эмбриональных герминативных клеток авторы выполнили исследование клеточных популяций эмбриональных герминативных клеток G1, полученных из полового бугорка 12,5-дневного эмбриона мыши линии BALB/c.

В анализ включили популяции клеток G1, полученные на 15-м и 75-м пассажах после их выделения из полового бугорка 12,5-дневного эмбриона мыши линии BALB/c, а также три пассажа (35/14, 35/26 и 35/40) сублинии G1-0A, выделенной из G1 на 35-м пассаже путем селекции на независимый рост от сывороточных факторов (1 %). Для получения метафазных пластинок клетки суспендировали и инкубировали 30 минут в растворе KCl (0,56%) при +37°C. Хромосомы фиксировали смесью метанола и ледяной уксусной кислоты (3:1), трижды меняя фиксирующий раствор. Препараты раскапывали на холодные влажные стекла, высушивали и окрашивали красителем Гимза («Merck», Германия).

Окрашенные цитогенетические препараты анализировали с помощью микроскопа Carl Zeiss при увеличении в 1000 раз. Метафазные пластинки фотографировали при помощи цифрового фотоаппарата Canon (PowerShot G6, Great Britain). Индивидуальное типирование хромосом проводили в соответствии с данными Cowell J.K. (1984). Анализировали количество хромосом и их качественный состав; для отдельных метафазных пластинок составляли кариограммы. Подсчет количества хромосом в клетках выполняли на фотографиях метафазных пластинок.

Изменчивость клеточных популяций по числу хромосом характеризовали по следующим показателям: пределам варьирования, долей клеток с модальным числом хромосом и шириной модального класса. В связи с выраженным разнообразием эмбриональных стволовых клеток по количеству хромосом учитывали количество клеток (в процентах от общего количества рассмотренных клеток) с близкими числами хромосом, которые встречались чаще, чем другие, и обозначали его как условно модальное число хромосом.

Анализ распределения клеток по числу хромосом позволил выявить их широкое разнообразие во всех исследованных пассажах клеток. Клетки на протяжении 75 пассажей сохраняли высокий уровень гетерогенности по присутствию различных клонов, отличающихся по числу хромосом. Наблюдалась определенная предпочтительность по представленности среди них клеток с гиперпента- и гипогексаплоидным набором хромосом.

Наиболее гетерогенной по присутствию клеток с разным числом хромосом оказалась клеточная популяция линии G1 самого раннего из исследованных пассажей - G1 15. По сравнению с другими пассажами в ней выявлялась относительно повышенная частота встречаемости гипергексаплоидных клеток. В пассажах сублинии G1-0A, полученной путем селекции клеток на

среде, обедненной сывороточными факторами, по сравнению с 15-м и 75-м пассажами линии G1, обнаруживалась некоторая стабилизация клеток по числу хромосом с тенденцией к увеличению доли гипотетраплоидных – гипопентаплоидных клеток к 35/40-му пассажиру сублинии G1-0A.

Во всех рассмотренных клеточных популяциях наблюдалась высокая частота центрических слияний хромосом (робертсоновские транслокации). В исходной линии ЭСК G1 на 15-м пассаже они встречались с частотой $2,1 \pm 0,3$ на одну клетку. Не уменьшалась частота их встречаемости и у сублинии 0A на 14-м, 26-м и 40-м пассажах ($2,2 \pm 0,3$; $2,2 \pm 0,2$ и $1,9 \pm 0,2$ соответственно).

Ранее высказывались предположения о том, что повышенная частота таких центрических слияний может быть связана с гиперплоидностью клеток (Яцышина А.П. и др., 2004). Однако авторы не обнаружили прямой связи между числом хромосом в клетках и присутствием робертсоновских транслокаций.

Как правило, центрические слияния наблюдались между гетерологичными хромосомами. В гетерологичных центрических слияниях принимали участие все без исключения хромосомы; в сублинии G1-0A на 35/14-м пассаже относительно чаще, чем другие, в таких слияниях участвовали хромосомы 5, 8, 9, 10, 12 и 14.

Для оценки особенностей хромосомного состава отдельные клетки каждого пассажа были кариотипированы. Кариотипирование метафаз сублинии G1-0A на 35/14-м пассаже показало, что в большинстве случаев хромосомы присутствуют в метафазных пластинках в 4-6 копиях, за исключением хромосом 6, 7 и 12, по которым обнаруживается определенный дефицит копий по сравнению с другими хромосомами. В относительно избыточном количестве копий представлена хромосома 11. Сходные тенденции наблюдались и в кариотипированных клетках других клеточных популяций линии G1.

Увеличение копийности хромосомы 11 выявлено в большом количестве линий эмбриональных стволовых клеток мыши. Это связывают с локализацией в хромосоме гена *Stat3*, участвующего в STAT3/JAK пути контроля клеточной пролиферации и, соответственно, накоплением клеток с увеличенной копийностью хромосомы 11 при их отборе в культуральных условиях на высокий уровень пролиферативной активности.

Одна из возможных причин относительного дефицита копий хромосом 6 и 12 обусловлена тем, что в клетках всех рассмотренных популяций встречалась транслокация между этими хромосомами. Авторами ранее была выявлена такая же транслокация в клетках миелом мышей той же линии BALB/c.

Транслокация t(6;12) не является типичной для клеток миелом; как правило, в них встречаются варианты t(6;15), t(12;15) – транслокации между хромосомами, несущими гены иммуноглобулинов (хромосомы 6, 12) и онкоген (хромосома 15) (Silva S. et al., 2003).

Показано, что способность ЭСК к самопроизводству без дифференцировки зависит от экспрессии комплекса генов, таких, как *Esrrb*, *Tbx3* и *Tell*, *Nanog*, *Oct4* и *Sox2*. Экспрессия *Oct4* необходима для предупреждения дифференцировки клеток в трофобластическом направлении. *Nanog* и *Sox2*, по-видимому, являются интегральными регуляторами, подавляющими многие дифференцировочные программы, а экспрессия генов *Esrrb*, *Tbx3* и *Tc11* необходима для блокирования программ клеточной дифференцировки в клеточные линии, производные эпибласта (Ivanova N. et al., 2006).

Nanog локализован в сегменте F2 хромосомы 6, *Tc11* – в сегменте E хромосомы 12, а *Esrrb* – в сегменте D2 хромосомы 12. *Tbx3* локализован в сегменте F хромосомы 5, а *Sox2* – в сегменте B хромосомы 3 (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Таким образом, транслокация t(6;12) объединяет три ключевых гена из пяти имеющихся, блокирующих клеточную дифференцировку и способствующих самокопированию клеток в отношении сохранения плюрипотентности. Интересно отметить, что в сегменте C хромосомы 12 локализован псевдоген *Nanog* PS2.

Судя по дифференциальной исчерченности перестроенной хромосомы, разрыв в хромосоме 12 проходит по сегменту E, в котором локализован ген *Tc11*. В хромосоме 6 разрыв попадает на сегмент C, расположенный существенно выше локализации *Nanog*.

На основании полученных данных, авторы предполагают, что присутствие одной и той же транслокации t(6;12) в клетках миелом, а также во всех рассмотренных популяциях эмбриональных герминтативных клеток G1 в определенной степени может быть связано со способностью опухолевых и эмбриональных герминтативных клеток сохранять полипотентность и избегать терминальных стадий дифференцировки.

Миеломы состоят из клеток-потомков высокоспециализированных В-лимфоцитов, способных к таким специализированным клеточным синтезам, как продукция иммуноглобулинов. Если предполагать наличие определенной связи между транслокацией t(6;12) и нарушением событий цитодифференцировки, то речь может идти только о поздних ее этапах.

Не исключено, что присутствие транслокации t(6;12) в миеломах и эмбриональных герминтативных клетках связано с общим происхождением клеток от линии мышей BALB/c, а также с тем, что для эмбриональных герминтативных клеток этого происхождения присутствие t(6;12) типично только для исследованной линии клеток ЭГ G1. Для выяснения этих вопросов требуются дальнейшие исследования.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в исследованных клеточных популяциях разных пассажей ЭГ G1, несмотря на селекцию в отношении независимости от сывороточных факторов, высокую гетерогенность по сочетанию клеток с разным числом Xp, постоянные процессы генерации популяционно-генетического разнообразия, о чем свидетельствуют широкие спектры Робертсоновских транслокаций, а также

наличие гипероктаплоидных клеток даже на 75-м пассаже эмбриональных герминтативных клеток G1, эта линия имеет свои кариотипические особенности. К основным из них, по-видимому, относятся высокая частота встречаемости робертсоновских транслокаций (около 2 на клетку), преобладание близости числа хромосом к пента- и гексаплоидному набору, а также присутствие транслокации t(6;12).

Авторы предполагают, что выявленные особенности свидетельствуют о наличии линейноспецифичных механизмов генерации генетической изменчивости, необходимой для адаптации клеток к росту в культуральных условиях в недифференцированном состоянии (Глазко А.Л. и др., 2007).

Глава 4. КЛОНИРОВАНИЕ КЛЕТОК И ЖИВОТНЫХ

Клонирование – это получение идентичных потомков при помощи бесполого размножения или процесс изготовления генетически идентичных копий отдельной клетки или организма.

Возможности клонирования открывают новые перспективы для садоводов–огородников, фермеров–животноводов, а также для медицинского применения. Одной из главных задач в данной области является создание коров, в молоке которых будет содержаться сыворотка человеческого алгаомина. Эта сыворотка используется для лечения ожогов и иных травм, и мировая потребность в ней составляет от 500 до 600 тонн в год.

Также задачей клонирования является создание органов животных, которые можно будет использовать для трансплантации человеку. Во всех странах существует серьезный недостаток донорских органов – почек, сердец, поджелудочных желез, печени, поэтому идея создания практически конвейерного производства трансгенетических свиней, по графику поставляющих органы для пациентов, специально подготовленных для приема этих органов, является насущной и не лишена перспектив.

Путём клонирования можно получать животных с высокой продуктивностью яиц, молока, шерсти или таких животных, которые выделяют нужные человеку ферменты (инсулин, интерферон, химозин).

Человеческие ферменты можно получать и более простым способом: взяв нужную клетку крови человека, необходимо клонировать её и вырастить клеточную культуру, которая в лабораторных условиях будет производить нужный фермент.

Комбинируя методы генной инженерии с клонированием, можно вывести трансгенные сельскохозяйственные растения, которые смогут сами себя защищать от вредителей или будут устойчивы к определённым болезням.

Важную роль в животноводстве сыграла разработка методов длительного хранения спермы в замороженном состоянии и искусственного осеменения. Исследования по клеточной и генной инженерии на млекопитающих развернулись только с освоением техники оплодотворения *in vitro*, обеспечившей получение достаточного количества зародышей на ранних стадиях развития.

Генетическое улучшение животных связано с разработкой технологии трансплантации эмбрионов и методов микроманипуляций с ними:

- получение однойцевых близнецов;
- межвидовые пересадки эмбрионов и получение химерных животных;
- клонирование животных при пересадке ядер эмбриональных клеток в энуклеированные яйцеклетки.

В 1996 году шотландским ученым из Эдинбурга впервые удалось получить овцу из энуклеированной яйцеклетки, в которую было пересажено ядро соматической клетки (вымени) взрослого животного. Эта работа открывает широкие перспективы в области клонирования животных и принципиальную возможность клонирования в будущем и человека. В этой же лаборатории получено еще пять клонированных ягнят, в геном одного из которых был встроен ген белка человека. Клеточная инженерия позволяет конструировать клетки нового типа с помощью мутационного процесса гибридизации и, более того, комбинировать отдельные фрагменты разных клеток (клеток различных видов, относящиеся не только к разным родам, семействам, но и царствам). Это облегчает решение многих теоретических проблем и имеет практическое значение.

Другое направление клеточной инженерии – манипуляции с безъядерными клетками, свободными ядрами и другими фрагментами, сводящиеся к комбинированию разнородных частей клетки. Эти эксперименты, а также микроинъекции в клетку хромосом, красителей проводят для выяснения взаимных влияний ядра и цитоплазмы, факторов, регулирующих активность генов.

Путём соединения клеток разных зародышей на ранних стадиях их развития выращивают мозаичных животных, или химер, состоящих из двух различающихся генотипами видов клеток. С помощью таких экспериментов изучают процессы дифференцировки клеток и тканей в ходе развития организма.

Ведущиеся уже не одно десятилетие опыты по пересадке ядер соматических клеток в лишённые ядра (энуклеированные) яйцеклетки животных с последующим выращиванием зародыша во взрослый организм с конца XX века получили широкую известность как клонирование животных.

Преимущество клеточной инженерии состоит в том, что она позволяет экспериментировать исключительно с клетками, а не с целыми организмами. Последнее гораздо сложнее, а иногда и невозможно, особенно в случае млекопитающих и животных и человека или при получении отдалённых гибридов. Методы клеточной инженерии в медицине, сельском хозяйстве, промышленности часто применяют в сочетании с *генной инженерией* (www.sbio.ru).

4.1. Способы клонирования

Метод клонирования возник в результате попыток доказать, что ядра зрелых клеток, которые закончили своё развитие, содержат всю информацию, необходимую для кодирования всех признаков организма. Специализация каждой клетки обусловлена включением определённых генов или их выключением, а не утратой некоторых из них. Первый успех был достигнут профессором Корнельского университета Стюардом. Он доказал, что, выращивая отдельные клетки съедобной части моркови в среде,

содержащей нужные питательные вещества и гормоны, можно индуцировать процессы клеточного деления, приводящие к образованию новых клеток моркови.

Первым, кто доказал возможность искусственного получения близнецов, был немецкий эмбриолог Дриш. Разделив клетки двуклеточного зародыша морского ежа, он получил два генетически идентичных организма. Первые успешные опыты по трансплантации ядер соматических клеток в яйцеклетку осуществили в 1952 году Бриге и Кинг, проводившие опыты с амебами. А в 1979 году англичанин Виладсен разработал метод получения однойцевых близнецов из эмбрионов овцы и коровы. Однако развития эмбрионов добиться не удалось. В 1976 году Дж. Гердон доказал возможность клонирования на лягушках, а в 1983 году учёным удалось получить серийные клоны взрослых амфибий.

Заставить клетку развиваться только с материнским диплоидным набором хромосом теоретически возможно двумя способами: терапевтическим и хирургическим. Терапевтический метод изобретён намного раньше. Более ста лет назад зоолог Московского университета А.А. Тихомиров открыл, что яйца тутового шелкопряда под воздействием различных химических и физических воздействий могут развиваться без оплодотворения. Такое развитие было названо партеногенезом. Но оно рано останавливалось – так как партеногенетические эмбрионы погибали ещё до вылупления личинок из яиц.

Б.Л. Астауров в 30-е годы XIX века в результате длительных исследований подобрал термическое воздействие, которое одновременно блокировало стадию мейоза, то есть превращение диплоидного ядра яйцеклетки в гаплоидное, и активировало неоплодотворённое яйцо к развитию. С ядром, оставшимся диплоидным, развитие заканчивалось вылуплением личинок, повторяющих генотип матери, включая пол.

Клонировать млекопитающих можно и хирургическим способом, заменив гаплоидное ядро яйцеклетки на диплоидное, взятое из клеток эмбрионов. Эти клетки ещё не дифференцированы, то есть не началась закладка органов, поэтому их ядра легко заменяют функцию диплоидного ядра только что оплодотворённой клетки. Таким методом в США У.Р. Бриггс и Т.Дж. Кинг (1952), в Англии Д.Б. Гордон (1960) получили генетические копии лягушки.

В 1997 году шотландец И. Уилмут из Рослингского института хирургическим путём воспроизвел знаменитую овцу Долли – генетическую копию матери. Для этого из клеток её вымени взяли ядро для пересадки в яйцеклетку другой овцы. Успеху способствовало то, что взамен инъекции нового ядра применялись воздействия, приводящие к слиянию лишённого ядра яйцеклетки с обычной неполовой клеткой. После этого яйцеклетка с заменённым ядром развивалась как оплодотворённая. Очень важно, что этот метод позволяет взять ядро клонируемой особи в зрелом возрасте, когда уже известны важные для человека ее хозяйственные

признаки. Но у Долли были не слишком удачные предшественники. Её создатель, Ян Уилмут, произвёл 277 ядерных трансплантаций: получил 277 эмбрионов, из которых только 29 прожили дольше шести дней, и один из которых развился в полноценного ягнёнка, названного Долли.

Профессор Нейфах и его сотрудники из Института биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН скопировали каспийского осетра для спасения его как вида. В клетке осетра убивали ядро, на его место вводили два сперматозоида и тепловым ударом заставляли их слиться воедино для удвоения набора хромосом в спермии. Далее задействовались сложные внутренние связи, создавались благоприятные условия для "выхаживания" зародышей, которые развивались в «искусственных осетров».

Ученые из университета штата Висконсин Нил Ферст и Таня Доминко для клонирования млекопитающих использовали яйцеклетку коровы, лишали ее генетического материала и имплантировали молекулы ДНК других клонируемых животных – свиньи, крысы, овцы или обезьяны. При этом источником наследственного материала служили клетки тканей взрослых особей, взятые, например, из свиного или крысиного уха. После искусственного оплодотворения из коровьей яйцеклетки, получившей новую генетическую информацию, развивался зародыш другого млекопитающего – копия генетического донора. В лабораторных условиях удалось благополучно вырастить эмбрионы свиньи, крысы, овцы, обезьяны и коровы. Эти работы имеют важное значение для развития генной инженерии и изучения возможностей генетического донорства. Данная методика в будущем сможет помочь сохранению исчезающих и редких видов животных.

Американские исследователи несколько изменили метод клонирования, используя ядра эмбриональных (зародышевых) фибробластов – клеток, дающих соединительную ткань, взятых из взрослого организма, и, тем самым, резко увеличили эффективность метода, а также облегчили задачу введения «чужого» гена, так как в культуре фибробластов это сделать значительно легче.

Сейчас перед человечеством не стоит вопрос: “Клонировать или нет?” Конечно, клонировать. Благодаря этому, в сельском хозяйстве можно получить высокопродуктивных животных или животных с человеческими генами, а также клонированные органы и ткани для трансплантации человеку. Стоит другой вопрос: «Разрешить ли клонирование человека?» С одной стороны, это возможность бездетных людей иметь своих собственных детей, получение клонов для последующего использования их в качестве доноров необходимых органов. С другой стороны, рассуждения в духе апокалипсиса о том, что в будущем клоны вытеснят и уничтожат «нормальных людей», этические, религиозные и другие проблемы. Вопрос допустимости клонирования человека остаётся открытым.

4.1.1. Технология получения партеногенетических линий эмбриональных стволовых клеток комбинацией с методом переноса ядра

Партеногенез – это процесс образования эмбриона из яйцеклетки, не оплодотворенной сперматозоидом. У некоторых животных этот процесс наблюдается в природе, но ни один вид млекопитающих не способен размножаться таким образом. Основные причины остановки развития – нарушение экспрессии генов из-за неправильной картины импринтинга.

Геномный импринтинг – одна из форм регуляции генной экспрессии, при которой транскрипция гена зависит от пола особи, от которой был получен аллель этого гена. Данная регуляция осуществляется посредством метилирования генов. При импринтинге уровень транскрипции некоторых генов определяется полом организма, от которого эти гены унаследованы. В этом случае вклады отцовского и материнского геномов в развитие организмов неодинаковы. Поэтому для нормального развития эмбриона необходим хромосомный материал особей разных полов. В экспериментах на мышах партеногенезом удается получить зародыш из нескольких десятков клеток, очень редко эти эмбрионы развиваются дольше (Kono T. et al., 2004).

Но получение партеногенетического клона не является первостепенной задачей ученых. Перспектива использования стволовых клеток партеногенетических эмбрионов (parthenogenetic embryonic stem cells – pESC) в терапевтических целях может решить этические проблемы, связанные с получением эмбриональных стволовых клеток (ESC – ЭСК) и обусловленные созданием и разрушением эмбриона для их получения. Эмбриональные стволовые клетки, полученные из партеногенетических эмбрионов, могли бы иметь большое терапевтическое значение, если бы была показана их способность к дифференцировке, так же, как и ЭСК, полученных обычным путём. Однако, применение pESC в медицине пока невозможно, так как у этих клеток нарушено развитие и способность к дифференцировке. Химерные мыши, полученные при смешении бластомеров нормальных и партеногенетических эмбрионов, задерживались в росте, у них наблюдалось частое образование опухолей (Holm T.M. et al., 2005).

Исследователям из Японии во главе с Takafusa Nikichi удалось повысить жизнеспособность и способность к дифференцировке pESC мыши с помощью технологии переноса ядра (nucleartransfer – NT). Ядро из pESC перенесли в энуклеированный овоцит, затем из него возникли новые клетки – NT-pESC. Таким способом сформировали 84 клеточные линии. Некоторые линии получили вследствие неоднократного переноса ядра. Все эти линии несли маркеры эмбриональных стволовых клеток и имели нормальный кариотип. Способность к дифференцировке этих клеток оказалась значительно выше, чем у обычных pESC, что показано серией экспериментов *in vitro* и *in vivo* (в химерных мышах).

Исследователи использовали две различные линии мышей для получения рESC, чтобы избежать нарушений развития, связанных с вырождением. Одна из этих линий – трансгенная – содержала маркерный белок GFP. Хромосомный материал одного овоцита перенесли в другой, затем искусственно запустили развитие. В результате получили партеногенетические эмбрионы, а затем и линии рESC. Далее их ядра перенесли в овоциты мыши другой линии и затем индуцировали развитие. Полученные таким образом ESC имели нормальный кариотип и экспрессировали маркёры плюрипотентности – Oct4, Nanog.

Выявлена возможность дифференцировки полученных клеток *in vitro* в нервную ткань и мезенхиму. В качестве контроля использовали две линии ESC, возникшие при обычном оплодотворении. Затем, NT-рESC использовали для получения химерных мышей. Органы этих мышей проанализировали на содержание клеток NT-рESC и их дериватов (по маркерному белку). В каждом образце определяли уровень метилирования импринтированных доменов, которые оказались гипометилированными по сравнению с нормой. При этом клетки NT-рESC химеризовали органы и дифференцировались в тканях мышей.

Таким образом, японская группа исследователей показала положительное влияние процедуры переноса ядра на потенциал развития партеногенетических эмбриональных стволовых клеток. Интересно, что в полученных линиях NT-рESC не наблюдали феномена потери X-хромосомы, что обычно бывает при партеногенезе. В данном эксперименте все кариотипические и эпигенетические характеристики линий сохранялись, как и у рESC, на протяжении нескольких пассажей (до 30). Кроме того, уровень успешного образования клеточных линий после переноса ядра партеногенетической клетки в овоцит оказался в 1,5-2 раза выше, чем при получении NT-ESC, когда донором ядра служили соматические клетки или нормальные ESC. Причины этого неясны.

Можно предположить, что улучшенное развитие, дифференцировка и жизнеспособность полученных клеток явились следствием отбора самых лучших клеток для донорства ядра и цитоплазмы, и этот отбор производился неоднократно в течение двух и более переносов генетического материала в овоцит. Возможно также, что здесь наблюдается влияние новой цитоплазмы овоцита на ядро. В любом случае, положительный эффект переноса ядра на жизнеспособность и потенциал развития клеток NT-рESC подтвержден серией экспериментов. Причины изменений потенциала развития еще предстоит выяснить. Использование партеногенетических клеток в медицине имеет многообещающие перспективы. Несмотря на генетические нарушения и аномальность развития этих клеток по сравнению с ESC, исследования в этой области имеют также большое фундаментальное значение (Лопатина Т., 2007).

4.1.2. Создание гистосовместимых эмбриональных стволовых клеток методом партеногенеза

Генетически совместимые плюрипотентные эмбриональные стволовые клетки, созданные методами переноса ядра и/или с помощью партеногенеза (пЭСК), могут являться потенциальным источником тканей для трансплантации при различных заболеваниях.

Результатом партеногенеза у многих животных является развитие нормального эмбриона без предварительного оплодотворения овоцита. Однако грызуны не относятся к таким видам, так как их пренатальное развитие требует экспрессии генов отцовского генома (пронуклеуса). Ранее сообщалось о получении пЭСК из партеногенетических бластоцист мышей и приматов (Cibelli J.V. et al., 2002). При развитии таких животных наблюдалось явление партеногенетического химеризма. У человека подобное явление описано при получении партеногенетических клеток кожи и гематопоетической системы. В 2004 году японской группой Tomohiro Kono впервые показана возможность рождения жизнеспособного потомства из партеногенетически развитых эмбрионов мыши (Kono T. et al., 2004).

Экспериментальный партеногенез у грызунов представляет собой остановку деления клеток во второй фазе мейоза с последующей стимуляцией специальными агентами в присутствии цитохалазина, который предотвращает процесс выброса полярного тельца из овоцита. Таким образом, сохраняется диплоидность, и «псевдозигота» может развиваться в бластоцисту, из которой и выделяются пЭСК. ПЭСК несут удвоившиеся гаплоидные клетки, то есть они преимущественно гомозиготны.

Ткани, полученные из гомозиготных клеток, будут нести один из двух родительских наборов генов гистосовместимости и, теоретически, они окажутся предпочтительнее для пересадки, поскольку риск их отторжения будет значительно снижен. Однако у гетерозиготных пациентов МНС-гомозиготные ткани могут атакаться натуральными киллерами, которые распознают нехватку одного из наборов антигенов гистосовместимости. Этот процесс называется «гибридная устойчивость» и часто проявляется при пересадке костного мозга. Поэтому идеальным вариантом явилась бы пересадка генотипированных МНС-совместимых клеток (Мелихова В.С., 2007б).

Американские ученые под руководством G. Daley (2006) из Harvard Stem Cell Institute (Harvard University, Boston, USA) разработали метод создания гистосовместимых пЭСК. Им удалось выделить и охарактеризовать плюрипотентные эмбриональные стволовые клетки, полученные партеногенезом, в которых поддерживалась экспрессия материнских локусов МНС. Ткани, возникшие из таких клеток, могут пересаживаться животным донорской линии без отторжения.

После партеногенетической активации овоцитов мышей и прерывания (остановки) их деления в первой или второй фазе мейоза пЭСК выделяли и

генотипировали. Авторы применяли специально разработанный метод – прямое секвенирование полиморфизмов (SNP-генотипирование) для определения линий пЭСК, которые несут последовательности главного комплекса гистосовместимости (МНС) донорского овоцита. Ткани, полученные после дифференцировки таких клеток, могли бы идеально приживаться после пересадки МНС-совместимым реципиентам – мышам.

Из 74% стимулированных овоцитов, развившихся до стадии бластоцисты, исследователи получили 72 линии пЭСК. После проведенного генотипирования полученных линий оказалось, что 33% (24 линии) из них гетерозиготны по генам МНС. Восстановление гетерозиготности произошло в процессе рекомбинации. Генотипирование фланкирующих маркеров 17-й хромосомы (которая несет гены главного комплекса гистосовместимости) подтвердило гетерозиготность исследуемых локусов уже у 8 линий. Именно эти линии ученые и назвали рекомбинантными МНС-совместимыми пЭСК. Эти линии культивировали на желатине в виде эмбрионидных телец в течение 14 дней, наблюдая за последующей экспрессией МНС. Все клетки этих линий экспрессировали МНС и имели преимущественно нормальный кариотип (Мелихова В.С., 2007б).

Для получения генетически идентичных клеток использован ещё один метод: индуцировали партеногенетическое деление зрелых овоцитов мышей гибридной линии C57BL/64CBA F1, изменяя процесс сегрегации парных гомологичных хромосом во время первой метафазы мейоза. При этом получались партеногенетические эмбрионы, которые являлись клонами донорского овоцита в результате предотвращения сегрегации гомологичных материнских и отцовских хромосом. В этом случае авторы получили 23 линии из 56% активированных овоцитов, а гетерозиготность по генам МНС наблюдалась у 21 линии.

Плюрипотентность полученных пЭСК исследователи подтверждали формированием тератом при пересадке клеток под кожу иммунодефицитным мышам. Кроме того, выявлялись спонтанно сокращающиеся кардиомиоцитарные колонии в культуре, и стандартное розеткообразование на полужидкой среде, характерное для клеток гемопоэтического ряда. При инъекции полученных пЭСК в бластоцисту развивались химерные мыши.

Полученные клонки пересаживали иммунокомпетентным животным после предварительной дифференцировки в культуре, так как недифференцированные эмбриональные стволовые клетки не экспрессируют молекул комплекса МНС (Rideout W.M. et al., 2002). Все линии, гетерозиготные и совместимые с реципиентами по МНС, идеально приживались в организме реципиента без видимых признаков отторжения и образования тератом. Во всех остальных случаях пересадок наблюдалось формирование тератом (Мелихова В.С., 2007б).

Таким образом, в работе продемонстрировали два разных способа получения партеногенетических линий мышинных эмбриональных стволовых клеток. Полученные пЭСК были генетически идентичны (совместимы) по

генам МНС с донорским овоцитом. Кроме того, генетический анализ позволил выделить и поддержать линии, несущие материнский генотип МНС.

Способность пЭСК приживаться в организме реципиента и дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков не вызывает сомнений, однако влияние потери гетерозиготности важнейшими районами генома на функции клетки в таком случае остается мало изученным. Ткани, полученные путем дифференцировки пЭСК и несущие один из двух наборов родительских генов МНС, способны приживаться в тканях гетерозиготных реципиентов (пЭСК из линии C57BL/6 приживаются при пересадке мышам гибридной линии C57BL/64CBA F1). На основе этих экспериментов можно предположить, что рЭСК, гомозиготные по основным гаплотипам МНС, могут служить источником клеток для пересадок. Некоторая разница будет наблюдаться лишь в случае с клетками, несущими полный набор МНС на своей поверхности, например, клетками костного мозга.

Метод получения партеногенетических зародышей мышей приводит к тому, что эмбрион несет удвоенный гаплоидный геном, который ранее описывался как преимущественно гомозиготный (кроме тех районов, которые стали гетерозиготными в процессе рекомбинации во время первой фазы мейоза). Результаты этой работы свидетельствуют в пользу того, что большинство локусов в пЭСК претерпевает рекомбинацию, в результате чего они несут почти полностью гетерозиготный геном. Активация незрелых овоцитов и ингибирование первого мейотического деления способствуют сохранению значительной гетерозиготности в геноме, кроме тех районов, которые возвращаются к гомозиготности посредством рекомбинации. Оба типа клеток (как полученные в первой, так и во второй фазе мейоза) могут отбираться для поддержания донорского МНС генотипа.

С использованием методики получения партеногенетических клонов описано 8 линий пЭСК из клеток в первой фазе мейоза, которые демонстрировали полную гетерозиготность во всех локусах. Однако все эти клетки оказались либо тетраплоидны, либо анеуплоидны. Следовательно, несмотря на то, что они несли весь материнский геном, их нельзя использовать в качестве источника для трансплантации (Мелихова В.С., 2007б).

Данные, представленные в работе, доказывают, что распознавание отдельных паттернов гомо-и гетерозиготности в геномах линий ЭСК методом SNP-генотипирования является надежным способом определения происхождения исследуемых эмбриональных стволовых клеток (получены ли они партеногенетическим путем, переносом ядра или естественным оплодотворением ооцита).

Таким образом, партеногенез, наряду с получением эмбриональных стволовых клеток из оплодотворенного овоцита и ЭСК, созданных методом переноса ядра, может стать одним из перспективных способов получения персональных эмбриональных стволовых клеток. Основное значение работы состоит в демонстрации способа анализа генетической рекомбинации в

процессе партеногенетической активации, который позволяет отличить паттерны рекомбинации, полученные в результате прерывания кариокинеза во время первой или второй стадии мейоза.

4.1.3. Гемопозитическая дифференцировка и терапевтический потенциал однородительских партеногенетических эмбриональных стволовых клеток

Эмбриональные стволовые клетки и их дериваты, полученные из партеногенетических эмбрионов, рассматриваются как один из альтернативных источников клеток для аутологичной пациентспецифичной клеточной терапии. Партеногенетические эмбрионы не способны нормально развиваться после имплантационного периода вследствие нарушения экспрессии импринтированных генов, но предимплантационное развитие у них, как правило, остается неизменным. Более того, в химерных животных (состоящих из клеток разного происхождения и генотипа) эти клетки встраиваются в ткань и функционируют, но нарушение экспрессии импринтированных генов приводит к дефектам развития.

Sigrid Eckardt и коллеги из Пенсильванского университета (Eckardt S. et al., 2007), использовали методику так называемых однородительских партеногенетических эмбрионов и исследовали возможность приживления стволовых клеток, выделенных из этих эмбрионов, во взрослом организме.

Однородительские партеногенетические линии ЭСК получали методом переноса пронуклеусов: в андрогенетические зиготы переносили мужской пронуклеус вместо женского и, наоборот, в гиногенетические зиготы – женский вместо мужского. Из таких зигот вырастили линии, которые использовались для инъекции клеток в нормальную бластоцисту. Созданные таким образом химерные эмбрионы развивались до 14 дней.

Партеногенетические линии несли маркер (GFP), поэтому присутствие клеток можно было определить как в химерных эмбрионах, так и после трансплантации во взрослых тканях. Для восстановления гемопоза фетальные клетки печени химер (как партеногенетические, так и нормальные) вводили в летально облученную мышь.

Фетальные клетки печени нормальных эмбрионов и партеногенетических химер реконструировали гемопоз с одинаковой эффективностью. Вклад партеногенетических и нормальных клеток в восстановление гемопоза оценивали через месяц после трансплантации. Уровень химеризма увеличивался, и через 6-9 месяцев после трансплантации в периферической крови большинство клеток имело партеногенетическое происхождение. Уровень химеризма не зависел от того, были ли клетки андро- или гиногенетические.

Количество нормальных, андро- и гиногенетических GFP-экспрессирующих клеток в лимфоидной, миелоидной и эритроидной популяции определялось одинаковым. Высокий уровень

трансплантированных клеток выявлялся в селезенке, тимусе и костном мозге. Наблюдались животные с полностью замещенными клетками и функционально активными форменными элементами крови. Серийные трансплантации подтвердили способность партеногенетических гемопоэтических клеток к самообновлению. Чтобы проверить, могут ли партеногенетические клетки развиваться при отсутствии нормальных клеток, проведен анализ их дифференцировки *in vitro* (Kennedy M. et al., 2003). Обе партеногенетические линии давали начало гемопоэтическим стволовым клеткам и всем линиям гемопоэтической дифференцировки. Таким образом, авторы не обнаружили различий в приживаемости и функционировании партеногенетических или нормальных эмбриональных стволовых клеток.

Выполнен анализ уровня экспрессии импринтированных генов гемопоэтических клеток до трансплантации и после нее. Андрогенетические клетки, изолированные из печени химер, имели более высокий уровень экспрессии генов, экспрессирующихся в норме с отцовских аллелей (*Dlk-1*, *Igf2*, и *Peg3*) по сравнению с нормальными или гиногенетическими клетками, и меньший уровень – для генов материнских аллелей (*Igf2r*). Гиногенетические клетки, наоборот, оверэкспрессировали гены, в норме транскрибирующиеся с материнских аллелей. Таким образом, партеногенетические клетки, выделенные из печени химер, имели зависящий от родительского происхождения характер экспрессии импринтированных генов. Анализ партеногенетических клеток, выделенных из взрослых реципиентов, показал нормальную экспрессию импринтированных генов.

Используя RT-PCR, авторы оценили уровень транскрипции импринтированных генов этих клеток и клеток периферической крови партеногенетического происхождения. Кроме гена *U2af1-rs1* никаких различий между экспрессией импринтированных генов не было выявлено. Анализ метилирования импринтированных локусов показал, что даже при нарушении метилирования в партеногенетических линиях среди клеток реципиента, образованных из этих линий, есть клетки с нормальной картиной метилирования. То есть, изменение метилирования происходит уже в организме при дифференцировке этих клеток.

Таким образом, показана реконструкция гемопоэза у летально облученных мышей после пересадки однородительских партеногенетических клеток фетальной печени. Гемопоэтическая дифференцировка *in vitro* показывает возможность этих клеток самостоятельно развиваться в гемопоэтические стволовые клетки, без влияния нормальных клеток, как это происходит в химерных мышах. В данной работе обнаружена их способность к пролиферации и даже замещению ткани взрослого органа вне зависимости от того, были ли клетки андро- или гиногенетические. Следовательно, эти клетки можно рассматривать как потенциальный ресурс для трансплантации и регенеративной медицины. Было показано, что эти клетки гистосовместимы по отношению к организму – донору ядра. Для возможного использования партеногенетических эмбриональных стволовых клеток в

клеточной терапии необходимы дальнейшие исследования (Лопатина Т., 2007).

4.1.4. Репрограммирование посредством эмбриональных стволовых гибридных клеток

Клонирование млекопитающих показало, что ядро коммитированной (соматической) клетки может быть репрограммировано до уровня тотипотентности, если его перенести в цитоплазму энуклеированного овоцита. После такого переноса, как полагают большинство исследователей, донорское ядро приобретает потенции посредством эпигенетических механизмов без изменения структуры ДНК. До 1998 года это была единственная технология восстановления потенций в соматических клетках. Между тем, эмбриональные стволовые клетки, полученные из внутренней клеточной массы бластоцист, также обладают плюрипотентными или даже тотипотентными свойствами, судя по их вкладу в разные органы и ткани развивающихся химер и способности в условиях *in vitro* дифференцироваться в гаметы. Предложено использовать потенциал ЭСК для репрограммирования индивидуальных хромосом или целого ядра соматических клеток путем слияния эмбриональных стволовых клеток со спленоцитами взрослых животных.

Уже первые эксперименты на эмбриональных стволовых гибридных клетках (ЭСГК) показали, что они сохраняют многие характеристики ЭСК, включая способность образовывать *in vitro* эмбрионидные тельца, содержащие различные специализированные клетки, и генерировать развитие химер. Несмотря на то, что реконструированные овоциты и эмбриональные стволовые гибридные клетки обладают репрограммирующей активностью, организация их геномов различна. В отличие от реконструированных овоцитов, ЭСГК содержат два генома с разной предшествующей «историей развития», которые, находясь в одном ядре, легко могут обмениваться транс-действующими регуляторными сигналами.

Кроме того, выявлена предпочтительная сегрегация (потеря) хромосом соматического партнера во многих независимых клонах эмбриональных стволовых гибридных клеток. Это позволило оценить роль цис- и трансрегуляции в поддержании плюрипотентного статуса эмбриональных стволовых гибридных клеток. Неожиданным оказалось, что в клонах ЭСГК с разным числом хромосом соматического партнера плюрипотентность проявлялась как доминантный признак, то есть практически она не зависела от присутствия соматических хромосом. Это предполагает, что плюрипотентность хромосом ЭСК поддерживается в ЭСГК цис-способом и вполне резистентна к действию транс-действующих факторов, исходящих от соматических хромосом. Что касается репрограммирования соматического генома или его отдельных хромосом в эмбриональных стволовых гибридных клетках, то имеются многочисленные данные, подтверждающие этот факт:

активация ранее сайленсированных генов и, наоборот, репрессия тканеспецифических генов, активных в соматическом геноме перед слиянием; реактивация неактивной X-хромосомы.

Согласно данным С.А.Cowan et al. (2005), геном фибробласта репрограммируется на 99% в гибридных клетках, полученных слиянием фибробластов человека с эмбриональными стволовыми клетками человека.

Таким образом, эмбриональные стволовые гибридные клетки являются новым мощным инструментом для восстановления потенций и репрограммирования либо целого генома, либо отдельных хромосом дифференцированных клеток (Серов О.Л., 2007).

4.2. Клонирование собаки, оленя

Команде исследователей из Кореи (Seoul National University) под руководством Woo Suk Hwang удалось впервые в мире клонировать собаку. До этого все попытки других исследовательских групп заканчивались неудачно. Собака породы Afghan клонирована переносом ядра кожного фибробласта в донорскую яйцеклетку. Всего выполнено более 1000 переносов эмбрионов в 123 самки-реципиента, 3 из них закончились беременностью и только 2 родами. Один щенок умер на 22-й день из-за развившегося респираторного дистресс-синдрома и пневмонии. В возрасте 7 месяцев второй щенок не имел проблем со здоровьем и развитием (Lee B.C. et al., 2005). В 2003 году совместно с Texas A&M University сотрудниками компании ViaGen Inc. впервые клонирован олененок Dewey (Берсенев В.А., 2006е).

4.3. Коммерциализация клонирования лошадей, коров, свиней

В 2006 году компания ViaGen Inc. (Austin, TX, USA) заявила об успешном коммерческом клонировании двух жеребцов от известных лошадей победителей в США. Оба жеребенка были здоровы и развивались абсолютно нормально, являлись первыми коммерческими клонами в США из 19 успешно забеременевших суррогатных кобылиц (Берсенев В.А., 2006е).

Наряду с кошкой и собакой, лошадь является одним из самых трудных объектов для клонирования, однако наиболее коммерчески привлекательным. Первый клон лошади появился в Италии в 2003 году (Laboratory of Reproductive Technology, Cremona). С тех пор создано еще несколько клонов в Италии (Cremona) и США (Texas A&M University). Отрасль мгновенно коммерциализировалась. В течение прошедшего года компания ViaGen продавала клонированных лошадей-чемпионов в Европе при участии своего стратегического партнера во Франции – Cryozootech AS. По сравнению с клонированием коров, предлагаемым рядом компаний за 30-50 тысяч долларов США, клонирование лошади-чемпиона оценивается в настоящий момент в 150 тысяч долларов США. Именно столько стоит

каждый жеребенок-клон, появившийся на свет в компании ViaGen. Такие суммы обусловлены высокой генетической ценностью лошадей-чемпионов. Например, от знаменитой Royal Blue Boon, по оценкам American Quarter Horse, продано потомства более чем на 2,5 миллиона долларов.

Компания ViaGen и Encore в настоящее время имеют банк генетического материала 75 лошадей – чемпионов и могут стать эксклюзивными лидерами на мировом рынке клонирования животных. Компания ViaGen Inc. предоставляет сервис по генетической идентификации пород, составлению генетических паспортов, банкированию генетического материала и клонированию редких и ценных пород животных. Компания уже продала более 140 клонированных свиней и более 70 коров-клонов (Берсенев А.В., 2006е).

4.4. Эпигенетический контроль развития млекопитающих в отсутствие отцовского генома

Партеногенетическое развитие млекопитающих строго ограничено геномным импринтингом (Surani M.A. et al., 1984). Суть геномного импринтинга состоит в том, что гены, передаваемые потомству от обоих родителей, несут специфический «отпечаток» (от англ. imprint) пола родителя, то есть отцовские и материнские гены маркированы по-разному. Эти «отпечатки» являются стабильными в течение всего онтогенеза, но могут быть «стерты» при формировании зародышевых половых клеток. Такой «отпечаток», как правило, обеспечивается с помощью эпигенетической метки (всевозможные эпигенетические модификации хроматина – метилирование ДНК, модификация гистонов). Потомство получает один набор хромосом с отцовской маркировкой некоторых генов, а другой – с материнской. При образовании у потомка половых клеток прежний «отпечаток» стирается, и эти гены маркируются *de novo* в соответствии с полом данной особи.

Эпигенетические модификации ДНК, определяющие геномный импринтинг, локализуются в определенных участках хромосом, называемых районами контроля импринтинга. Так, в процессе сперматогенеза метилируются три специфических района, расположенных на 7, 9 и 12-й хромосомах мыши (Lin S.P. et al., 2003). В геноме человека регуляторные центры импринтинга обнаружены на 11-й хромосоме (2 центра импринтинга – *IGF2/H19* и *KCNQ1OT1*) и на 15-й хромосоме (*SNURF-SNRPN*) (Лебедев И.Н., Саженова Е.А., 2008).

В исследовании, опубликованном в *Nature biotechnology*, японские ученые создали биматеринские эмбрионы с использованием незрелых овоцитов, полученных от мышей, имеющих делеции как в районе гена *H19-DMR* на 7-й хромосоме (*ch7+/-*, или *ch7-/-*), так и в *Dlk1-Dio3* районе контроля импринтинга на 12-й хромосоме (*ch+/-*) (Kawahara M. et al., 2007). Первую яйцеклетку брали у взрослой мыши на стадии герминативной везикулы, а вторую - у новорожденного животного (1 день после рождения)

на стадии диплотены первого мейоза. У зрелой яйцеклетки удаляли ядро и энуклеированный овоцит сливали с незрелой яйцеклеткой с помощью вируса, а веретено деления полученной реконструированной клетки вторично перенесли в оволировавший овоцит («серийный перенос ядра») (Мелихова В.С., 2008б).

Способность к развитию у биматеринских зародышей была проанализирована с помощью 3D культивирования 323 реконструированных овоцитов и трансплантации 286 полученных в итоге бластоцист у 29 самок. На сроке беременности 19,5 дней удалось получить 42 живых мыши. Все они были гетерозиготны по двойным мутациям на 7-й и 12-й хромосомах, доказывая тот факт, что мыши лишь с таким геномом выживали в эксперименте. 27 мышей достигли взрослого возраста, а их вес не отличался от веса мышей дикого типа. У 11 мышей наблюдалась значительная задержка развития и они погибли через 3 дня. Общий уровень выживаемости таким образом составил 39,4% (ранее – 0,5%), что соответствует показателям выживаемости после экстракорпорального оплодотворения. Авторы связывают задержку в развитии с подавлением транскрипции гена *Rasgrf1* (расположенного на 9-й хромосоме), которая регулируется метилированием по отцовскому типу и вызывает секрецию гормона роста.

Исследователи предполагают, что строгий барьер для партеногенеза обеспечивается независимо материнским и отцовским геномами (а точнее – метилированием этих геномов в определенных областях). При этом, импринтинг по материнскому типу является основным барьером на пути к партеногенетическому развитию на стадии имплантации, а отцовский геном отвечает уже за более поздние стадии развития. Причем эта закономерность зависит от того, в каком статусе (метилированном или деметилированном) находятся 7-я и 12-я хромосомы, которые импринтируются по отцовскому типу. Восстановление регуляции генной экспрессии в двух рассмотренных районах контроля импринтинга необходимо для нормального развития (Мелихова В.С., 2008б).

Работа дополняет все предыдущие исследования о роли эпигенетических модификаций в отцовском или/и материнском геномах в развитии млекопитающих. Существовало мнение, что для эффективного переноса ядра требуются различные отцовские факторы, например, РНК сперматозоидов (Ostermeier G.C. et al., 2004). Однако данная работа свидетельствует о том, что отцовские транскрипты, возможно, вообще не являются значимыми для развития особи после слияния гамет (Мелихова В.С., 2008б).

4.5. Методика клонирования эмбрионов приматов

Вероятность рождения жизнеспособного потомства после переноса ядра соматической клетки (ПЯСК) остаётся крайне низкой, но приближается к 13% у некоторых видов успешно клонированных животных (Wakayama T. et al., 2002). Все заявления о клонировании человека в научном обществе

считаются фикцией (Schatten G. et al., 2003). Идея о возможности клонирования приматов может максимально приблизить человечество к возможности клонирования человека как вида и усовершенствования технологии ПЯСК для клеточной терапии и создания индивидуальных банков эмбриональных стволовых клеток. Приматы могут послужить «прочеловеческой» моделью для изучения механизмов репрограммирования ядра соматической клетки, влияния эпигенетических факторов, цитоплазматического наследования, биологии ЭСК, условий оптимального развития эмбрионов до и после имплантации (Берсенев А.И., 2005б).

Первые клонированные приматы получены методом переноса ядра эмбриональной клетки (бластомеров) несколько лет назад (Meng L. et al. 1997; Chan A.W. et al. 2000). Все предшествующие попытки клонировать обезьян методом ПЯСК оказались безуспешны. В 2002 году удалось получить бластоцисту приматов при ПЯСК с общей вероятностью успеха < 1% (Mitalipov S.M. et al., 2002). В 2003 году группа С. Simerly сообщила о серьёзных проблемах, связанных с нарушениями расхождения хромосом при делении яйцеклетки приматов после ПЯСК в метафазе II (Simerly C. et al., 2003).

Simerly C. et al. (2003) успешно применили инновационную технологию Hwang для решения проблем, связанных с развитием предимплантационных эмбрионов приматов после ПЯСК. Энуклеацию яйцеклеток производили по методу Hwang в прометафазе II. Ядра выделяли из аутологичных кумулюсных клеток и аллогенных линий кожных фибробластов приматов (после 24 пассажей). Для контроля производили также перенос ядер клеток бластомеров, выделенных из 16-32-клеточных эмбрионов. Активацию и культивирование эмбрионов выполняли по описанным ранее протоколам.

После четырех дней культивирования бластоцисты переносили в матку суррогатной матери. С помощью микроскопической техники вели прижизненное наблюдение за эмбрионами. Наилучших результатов добились при использовании протокола электрослияния с одновременной активацией. Так, при переносе аллогенных ядер фибробластов получали жизнеспособные бластоцисты в 43% попыток из удачно слившихся. При переносе ядер фибробластов получали эмбрионы с нормальным кариотипом.

Однако, при переносе ядер аутологичных кумулюсных клеток не удалось получить ни одной бластоцисты (и только 1 морулу) при использовании трех различных протоколов активации. Наблюдали несколько ускоренное развитие эмбриона *in vitro* по сравнению с оплодотворёнными яйцеклетками. Хорошая внутренняя клеточная масса обнаруживалась только в двух из четырех полученных бластоцист. Эмбриональные стволовые клетки, выделенные из этих бластоцист, прекращали рост в культуре через неделю. Из 135 переносов эмбрионов в матку суррогатной матери (n=25) ни один не завершился развитием беременности.

В контроле перенос эмбрионов (147 эмбрионов 41 реципиенту), оплодотворённых *in vitro*, в 14,6% случаев приводил к развитию

беременности. Несмотря на кажущуюся нормальную морфологию ранних эмбрионов, многие ядра быстро развивали анеуплоидию и дезагрегацию ДНК уже в телофазе первого митоза. Нарушалось расхождение хромосом и веретена деления.

Нарушения деления были выявлены на уровне четырех, восьми и последующих клеточных стадиях. При переносе ДНК сперматозоида в энуклеированную яйцеклетку в 80% наблюдений не обнаруживали каких-либо нарушений инициации и первых делений. Тем не менее, при последующих делениях вновь наблюдали хромосомные дефекты, и только в 24% наблюдений удавалось получить абсолютно нормальные 8-клеточные эмбрионы. Установлено, что дисфункция формирования митотического веретена связана с недостаточностью специфических белков NuMA, HSET и Eg5 (Берсенев А.И., 2005б).

Таким образом, приматы являются одним из самых трудных объектов для клонирования. Для нормального развития раннего эмбриона приматов необходимо наличие центросом сперматозоида и комплекса мейотического веретена яйцеклетки.

Выявлены причины неудачных попыток создания жизнеспособных эмбрионов приматов и разработаны оптимальные методы получения бластоцист, готовых для выделения эмбриональных стволовых клеток или имплантации в матку с последующим созданием клона. Распознавание механизмов развития эмбриона после ПЯСК может иметь значение для изучения цитоплазматического наследования и причин формирования дефектов в постимплантационном периоде и после рождения жизнеспособных клонов. Только 20% клонированных бластоцист (и 50% бластоцист, полученных путём оплодотворения) приматов имеет хорошую внутреннюю клеточную массу, из которой можно выделить жизнеспособные линии ЭСК. Тем не менее, именно эти технологии можно использовать для выделения иммуносовместимых эмбриональных стволовых клеток для клеточной терапии. До сих пор так и не удалось получить методом клонирования постимплантационный жизнеспособный эмбрион приматов. Все попытки переноса бластоцист в матку оказались безуспешными – беременность не возникла ни в одном случае. Можно предположить, что аналогичные проблемы будут возникать и при попытках репродуктивного клонирования человека (Берсенев А.И., 2005б).

4.6. Зависимость эффективности клонирования от степени дифференцировки клетки-донора ядра

За последние 10 лет экспериментов по переносу ядра соматической клетки в энуклеированный овоцит с целью клонирования организмов или создания линий эмбриональных стволовых клеток установлено, что успех процедуры зависит от степени дифференцировки клетки-донора ядра. Постулировано, что при использовании ядра эмбриональной стволовой

клетки вероятность рождения жизнеспособных клонов повышается в 5-10 раз (Rideout W.M. et al., 2001). Это привело к рождению гипотезы использования ядра «взрослой» стволовой клетки для улучшения результативности процедуры клонирования (Blelloch R. et al., 2006).

Логично предположить, что «полностью репрограммировать» ядро стволовой или прогениторной клетки теоретически легче, чем терминально дифференцированной. Справедливость такого подхода совсем недавно показана в эксперименте, использующем в качестве донора ядра нейтральную стволовую клетку (Blelloch R. et al., 2006). Кроме того, попытки клонирования мыши из постмитотического обонятельного нейрона (Eggan K. et al., 2004), зрелых Т- и В-лимфоцитов (Hochedlinger K. et al., 2002) оказывались удачными только при применении двухшагового протокола путём химеризации бластоцисты или тетраплоидного эмбриона клонированными ЭСК (Eggan K. et al., 2004; Hochedlinger K. et al., 2002).

Международная группа исследователей из нескольких университетов США и Японии недавно завершила интересное исследование, показывающее зависимость эффективности клонирования мыши от степени дифференцировки клетки-донора ядра. Исследователи предположили, что вероятность развития и рождения клонов будет выше при переносе ядра зрелой постмитотической клетки по сравнению со взрослой стволовой. Гипотеза базировалась на результатах недавней работы японской группы К. Inoue из университета RIKEN, продемонстрировавшей, что эффективность репрограммирования ядра и клонирования мыши из гемопоэтической стволовой клетки неожиданно оказалась очень низкой (Inoue K. et al., 2006). В настоящем исследовании авторы также использовали гемопоэтические клетки одной линии дифференцировки, поскольку гемопоэтические стволовые клетки у мыши, на сегодняшний день, являются самыми хорошо описанными примерами «взрослых» стволовых клеток. Результаты работы опубликованы в журнале *Nature Genetics* (Берсенев А.В., 2006в).

Для сравнения эффективности клонирования использованы ядра высокоочищенных клеток крови одной линии дифференцировки – гемопоэтической стволовой (ГСК), гемопоэтической прогениторной клетки (ГПК) и постмитотического гранулоцита (ПГ) мыши. Эффективность клонирования ранних эмбрионов (на стадии морулы-бластоцисты) оказалась значительно ниже при использовании ГСК (8%) по сравнению с ГПК (11%) и ПГ (35%). Большинство эмбрионов, полученных от гемопоэтической стволовой клетки, останавливалось на развитии 2-4-клеточной стадии. Удалось получить 2 мышат при переносе ядра постмитотического гранулоцита, частота клонирования при этом составила 1,1%. В контрольных экспериментах использование ядер кумулюсных и эмбриональных стволовых клеток привело к развитию бластоцист с частотой 53,3 и 49%, соответственно, а также к рождению клонированного потомства в 3 и 9% случаев, соответственно, что совпадает с данными, полученными другими группами исследователей (Rideout W.M. et al., 2001).

Авторы указывают, что это первое документированное исследование, показывающее возможность клонирования мыши непосредственно путем переноса ядра постмитотической терминально дифференцированной клетки. Все клетки-доноры ядер в эксперименте тщательно охарактеризованы фенотипически (получены методом клеточного сортирования) и функционально (реконструкция костного мозга после пересадки ГСК и ГПК, исследование колониеобразования). Показано, что гранулоциты, используемые в работе, не пролиферировали. В отличие от этой работы, все клетки, используемые другими группами (Inoue K. et al., 2005) исследователей (кумуляционные, НКТ, фибробласты) были способны митотически делиться. Попытка использования постмитотической клетки приводила к успеху только при использовании двухступенчатого протокола (химеризации зародыша клонированными ЭСК) (Hochedlinger K. et al., 2002; Eggan K. et al., 2004).

Безусловным достоинством работы является использование системы одного «гемопоэтического дифферона» (ГСК-ГПК-ПГ) для сравнения эффективности клонирования в зависимости от степени дифференцировки клетки-донора. Авторы не смогли объяснить, почему ГСК (взрослая стволовая клетка) обладает меньшим потенциалом к репрограммированию и клонированию, чем зрелые клетки. Аналогичные результаты при использовании ГСК получены ранее и японской группой (Inoue K. et al., 2006).

Сравнительные исследования глобальной генной экспрессии позволят идентифицировать гены или эпигенетические признаки, ответственные за большую частоту репрограммирования клеточного ядра. Поскольку использование эмбриональных стволовых клеток по-прежнему приводит к самой высокой частоте клонирования, постольку предполагается, что общие гены «стволовости» ЭСК и ГСК, по-видимому, не отвечают за репрограммирование ядра клетки при его переносе в овоцит. R. Blelloch et al. (2006) указывают, что частота репрограммирования в цитоплазме овоцита зависит от степени метилирования донорского ядра (Blelloch R. et al., 2006).

Таким образом, полученные данные опровергают популярную гипотезу о возможном улучшении эффективности репрограммирования ядра и клонирования организмов при использовании менее дифференцированной клетки-донора ядра ?? (взрослой стволовой или прогениторной). Интересно проверить эти данные на клетках человека. Кроме того, поскольку в эксперименте с использованием нейтральных стволовых клеток получены противоположные результаты (Blelloch R. et al., 2006), то в будущем предстоит сравнить несколько типов взрослых стволовых клеток в рамках одного исследования (Берсенев А.В., 2006в).

4.7. Репрограммирование ядра гемопоэтической клетки при его переносе

Эксперименты по переносу ядра в энуклеированный овоцит показали, что генетические и эпигенетические изменения, приобретаемые клеткой в

процессе дифференцировки, могут быть полностью «репрограммированы». При переносе ядра соматическая клетка может вернуться в плюрипотентное состояние и дать начало новому эмбриону, из которого могут быть изолированы совместимые эмбриональные стволовые клетки (embryonic stem cells, ESC) (Rideout W.M. et al., 2001). Однако, частота выделения линии ESC из бластоцисты, полученной переносом ядра крайне низка и составляет в среднем 1 линия из 200-300 переносов.

Считается, что частоту удачных попыток переноса может увеличить использование ядер от незрелых стволовых клеток дефинитивных тканей (Rideout W.M. et al., 2001; Blelloch R. et al., 2006). Так, если донором ядра является ESC, процент рожденных клонированных животных может достигать 20. Если же донор – соматическая дифференцированная клетка, то число рожденных плодов значительно снижается. Поэтому существует предположение, что в дифференцированных соматических клетках генетические и эпигенетические модификации труднее изменить и перепрограммировать в цитоплазме овоцита (Blelloch R. et al., 2006; Rideout W.M. et al., 2001).

В настоящее время достаточно хорошо охарактеризованы гемопоэтические стволовые клетки (hematopoietic stem cells, HSC). Одна такая клетка способна восстановить гемопоэз летально облученной мыши. Пластичность генома HSC позволяет получить из них клетки не только гемопоэтической линии (Krause D.S. et al., 2001). Таким образом, HSC могли бы стать хорошим альтернативным донорским источником для переноса ядра и теоретически повысить частоту создания жизнеспособных клонов.

Основываясь на этих данных, ученые из RIKEN Bioresource Center (Tsukuba, Japan) проверили гипотезу о том, что гемопоэтические стволовые клетки могут быть «выгодными» донорами ядер для клонирования, так как у них относительно пластичный геном. Авторы протестировали способность к репрограммированию и клонированию гемопоэтических стволовых клеток, выделенных из самок и самцов мышей разных линий, в сравнении с фибробластами, кумулюсными и клетками Сертоли, стандартно применяющимися для клонирования.

Основная часть реконструированных эмбрионов культивировалась в течение 48 часов, а затем переносилась в организм самки. Во всех экспериментальных группах около 90% клонированных зигот делились в первые 24 часа, однако в течение следующих суток только 34% ГСК-образованных эмбрионов давали 4 клетки, тогда как в других группах большинство клонов достигло 4-клеточной стадии. Частота развития ГСК-эмбрионов в бластоцисту оказалась неожиданно низкой (5,9%), тогда как почти половина (45,8%) клонов из кумулюсных клеток развивалась нормально. 4-клеточные эмбрионы были перенесены в организм самок-реципиентов. Всего два мышонка родилось из ГСК-клонов и только из клеток одной линии. Клонированное потомство родилось во всех контрольных группах: из клеток Сертоли – 6, из кумулюсных – 8 и из

фибробластов – 5 мышат. Таким образом, клоны, полученные из гемопоэтических стволовых клеток, показали самый низкий потенциал развития, как на ранних, так и на более поздних стадиях развития.

Считается, что геном донорского ядра «перепрограммируется» при его переносе в цитоплазму овоцита в определенное время, когда происходит переключение активности материнского генома на эмбриональный геном. Это так называемая эмбриональная активация генов (*embryonic gene activation, EGA*). У мышей такая активация начинается еще на стадии зиготы, но в основном она происходит на двухклеточной стадии (Hamatani T. et al., 2004; Evsikov A.V. et al., 2004). Поэтому, скорее всего, остановка в развитии клонированных эмбрионов происходит при нарушении эмбриональной активации генов.

Для выяснения молекулярно-генетических причин этого процесса K. Inoue с коллегами исследовали эмбрионы при переходе из 2-х в 4-клеточную стадию (точка появления разницы в развитии ГСК-эмбрионов). Для сравнения изучались нормальные эмбрионы, а также эмбрионы, полученные искусственным оплодотворением и клонированные из гемопоэтических стволовых и кумулюсных клеток. Выявили, что в эмбрионах, полученных от разных клеток, уровень экспрессии 6 основных генов, активных в основной стадии EGA (Krause D.S. et al., 2001), различен. Например, уровень транскрипции гена *Hdac1* (histone deacetylase 1) оказался высок во всех трех группах, кроме ГСК-эмбрионов. Известно, что этот ген слабо экспрессируется на одноклеточной стадии развития эмбриона и сильнее на дву- и четырехклеточной. *Hdac1* взаимодействует с обширной генной сетью и считается ключевым геном деацетилаз, активируемым в эмбрионе сразу после оплодотворения. Возможно, он играет одну из важнейших ролей в регуляции экспрессии генов раннего развития, так как при его подавлении гиперацетилирование гистонов приводит к полной блокировке дальнейшего развития на двухклеточной стадии (Ma J. et al., 2001).

Анализ с использованием антител на ацетилированные гистоны в ГСК-эмбрионах подтвердил повышенный уровень ацетилирования, то есть пониженная активность *Hdac1* ведет к изменениям на хроматиновом уровне. В то же время, гены *Endomucin*, *CD45* и *c-kit*, которые, как известно, активны в гемопоэтических стволовых клетках, в клонированных ГСК-эмбрионах не транскрибировались.

Авторы рассматриваемой работы впервые показали возможность рождения клонированных мышей переносом ядра от донорской ГСК. В то же время ожидалось, что эффективность клонирования будет выше, чем при использовании других соматических клеток, так как геном гемопоэтической стволовой клетки проявляет большую пластичность. Однако, частота развития клонированных эмбрионов с ядрами ГСК оказалась неожиданно низкой на всех стадиях, начиная с 4-клеточной, сравнительно с клонами, полученными от ядер других клеток-доноров. На основании анализа экспрессии генов было показано нарушение активации эмбрионального генома.

Низкий уровень развития ГСК-клонов даже по сравнению с клонами из лимфоцитов (Inoue K. et al., 2005), говорит о том, что «стволовость» донорского ядра не всегда улучшает эффективность клонирования. Одной из основных причин может быть низкая активность гена *Hdac1* в гемопоэтических стволовых клетках, что приводит к гиперацетилированию гистонов. Вероятно, что разница в экспрессии проанализированных генов зависит от доступности гиперацетилированной ДНК к транскрипционным факторам.

Таким образом, К. Inoue и его коллеги получили важный результат, заключающийся не только в клонировании мышей с использованием гемопоэтических стволовых клеток, но и в сравнительном анализе, показывающем низкий уровень перепрограммирования ядра ГСК. Возможно, что аналогичная недостаточность перепрограммирования будет наблюдаться и с ядрами взрослых стволовых клеток человека. Вопрос выбора оптимальной клетки-донора ядра клонирования остается актуальным (Лопатина Т.В., 2006а).

Исследовательская группа Wakayama из японского RIKEN Center for Developmental Biology, занимающаяся репродуктивным клонированием, усовершенствовала технику переноса ядра и получения клонов мышей. Оказалось, что частота успеха при переносе ядра соматической клетки равна частоте при переносе ядра эмбриональной стволовой клетки. Группа добилась самой высокой частоты получения жизнеспособных клонов мышей.

Таким образом, авторы опровергают догму клонирования, гласящую, что частота получения клонов переносом ядра эмбриональной стволовой клетки (незрелой) значительно выше, чем при переносе ядра зрелой соматической клетки. Пока такие результаты удалось получить только у мышей (Корочкин Л.И., 2006; Wakayama S. et al., 2005).

4.8. Использование митотической зиготы для репрограммирования ядра соматической клетки и клонирования

До сих пор клонирование животных и получение эмбриональных стволовых клеток основано на технологии переноса ядра соматической клетки ядер в мейотические овоциты. Попытки перенести ядро соматической клетки в оплодотворенный овоцит (зиготу в интерфазе) чаще всего оканчивались неудачей. В связи с этим, с целью получения «собственных» линий человеческой ЭСК (ЧЭСК) традиционно для процесса переноса ядра принято использовать неоплодотворенные человеческие овоциты.

Исследовательская группа под руководством К. Eggan из Harvard Stem Cell Institute сообщила о том, что мышинные зиготы (остановленные в митозе) способны поддерживать репрограммирование соматической клетки и могут использоваться как для получения линий эмбриональных стволовых клеток, так и для клонированных животных (Egli D. et al., 2007). Таким образом,

человеческие зиготы и, возможно, бластомеры, помимо овоцитов, могут стать реальными кандидатами для использования в технологии создания индивидуальных линий ЧЭСК (Мелихова В.С., 2007а).

В первых успешных экспериментах по переносу ядра на грызунах исследователи провели обмен пронуклеусами между двумя оплодотворенными зиготами (McGrath J. et al., 1983). Полученные эмбрионы развились в полноценных взрослых животных. Однако при проведении похожих экспериментов с использованием ядер на стадиях дробления такого результата не получили, поэтому предположили, что клонирование млекопитающих невозможно, так как репрограммирование позднего ядра заблокировано. В то же время, обнаружено, что цитоплазма неоплодотворенного овоцита способна вносить изменения в программу перенесенного ядра, вследствие чего были реализованы проекты по клонированию овцы, кролика, свиньи и мыши (Chesne P. et al., 2002; Polejaeva I. A., 2000).

Показано, что потенциал развития зародыша после переноса ядра в неоплодотворенный овоцит существенно выше такого потенциала развития зародыша с переносом в оплодотворенный или искусственно активированный овоцит. То есть, потенциалы яйцеклетки, необходимые для успешного развития особи после переноса ядра, теряются (изменяются) после ее оплодотворения. Таким образом, для процедуры переноса ядра с целью получения индивидуальных линий ЧЭСК необходимы неоплодотворенные овоциты (Мелихова В.С., 2007а).

K.Eggan et al. (2004) предположили, что факторы, необходимые как для репрограммирования или/и эмбрионального развития, присутствующие в цитоплазме неоплодотворенных мейотических овоцитов, становятся изолированными (уединенными) в пронуклеусах зигот. Такая компартиментализация может объяснить невозможность энуклеированной интерфазной зиготы поддерживать развитие после переноса ядра, так как удаление пронуклеусов во время энуклеации может элиминировать одновременно и эти факторы, тем самым, предотвращая дальнейшее развитие. Удаление конденсированных хромосом во второй метафазе мейоза из овоцита, напротив, не влияет на эти процессы. Если эта модель верна, то разрушение ядерного конверта (ядерной оболочки) при вступлении в первый эмбриональный митоз, может привести к высвобождению критических факторов в цитоплазму, что позволит убирать хромосомы без удаления необходимых сигналов к развитию.

Для того, что бы определить, может ли цитоплазма митотической зиготы поддерживать репрограммирование ядра, исследователи обратимо затормозили зиготы в митозе, удалили хромосомы и заменили их хромосомами либо эмбриональной, либо соматической донорской клетки. Удалось обнаружить, что такие генетически реконструированные зиготы могут использоваться для получения клонированных животных и линий ЭСК.

Мышиные зиготы синхронизировали на стадии двух отдельных пронуклеусов путем разборки микротрубочек в митозе. Другие зиготы были синхронизированы таким же способом в интерфазе. Затем оба пронуклеуса в интерфазных зиготах удалялись, а вместо них трансплантировали пронуклеусы другой группы зигот. В таком случае происходило полное развитие. При пересадке ядер от 2-дневного эмбриона наблюдалось формирование бластоцисты, однако с гораздо более низкой эффективностью (70%) (Мелихова В.С., 2007а).

Важнейшим результатом работы явилось получение клонированных животных. Для этого вместо вынесенных хромосом использовались хромосомы культивируемых линий эмбриональных стволовых клеток. Для того, чтобы различить хромосомы из ЭСК (донора) и хромосомы зиготы (реципиента), хромосомы донора несли флуоресцентную метку, связанную с гистоном H2В. Эмбриональные стволовые клетки были остановлены в митозе с помощью специального вещества – нокодазола. Их хромосомы перенесли в делящуюся зиготу без веретена деления. Полученные клетки начинали дробиться. 174 зародыша на стадии морулы и бластоцисты имплантировали в матку псевдобеременным мышам. Из этого количества на 19,5-й день (после проведения кесарева сечения) обнаружено 9 жизнеспособных плодов. 7 из них не смогли нормально дышать и погибли, двое остались в живых и развились во взрослых особей. Клетки, выделенные из всех 9 зародышей, имели меченые хромосомы в ядре. Последнее свидетельствовало о том, что они являлись клонами клеток-доноров хромосом линий эмбриональных стволовых клеток. Клонированных эмбрионов также отличала значительно увеличенная плацента.

Также показано, что из клонированных зародышей, возникших при переносе хромосом, можно получить линии эмбриональных стволовых клеток. Так, после переноса хромосом из фибробластов кожи в овоцит эмбрионы развивались до стадии бластоцисты и использовались для получения ЭСК. Из 21 полученной бластоцисты 14 прикрепилась к мышинному фидеру, в 8 случаях удалось добиться пролиферации клеток внутренней клеточной массы. В 6 случаях удалось получить собственно линии эмбриональных стволовых клеток (Мелихова В.С., 2007а).

Итак, мейотические овоциты и митотические зиготы способны изменять ход событий в соматическом геноме, тогда как энуклеированные и интерфазные зиготы – нет. Возможно, это объясняется тем, что существуют факторы, которые разрушаются (обратимо разбираются) и обновляются во время каждого клеточного цикла. Однако, один или более факторов, ответственных за нормальное развитие эмбриона или репрограммирование, перемещаются в пронуклеусы во время интерфазы.

Таким образом, перемещение пронуклеусов одновременно перемещает и эти факторы. Во время мейоза и митоза многие регуляторные молекулы выходят из ядра в цитоплазму, а конденсированные хромосомы могут быть

удалены из овоцита или зиготы без перемещения этих молекул или влияния на их активность.

Клонирование животных основано почти полностью на использовании неоплодотворенных овоцитов и требовало искусственной активации овоцитов. В связи с этим появилось предположение о том, не влияет ли такая искусственная активация на жизнеспособность клонов и их аномалии. Эксперименты подтвердили, что нормально оплодотворенные овоциты, использованные в технологии переноса ядра, могут развиваться в нормальные эмбрионы. Перенос хромосом в митотическую зиготу исключает необходимость в искусственной активации, так как развитие уже запущено (слиянием со сперматозоидом).

Мыши, полученные после переноса хромосом из ЭСК в зиготы, имели две основные аномалии развития: неонатальную дыхательную недостаточность и увеличенную плаценту. Эти аномалии часто описывали и другие исследователи, однако они не связывали их с искусственной активацией овоцитов. Кроме того, мыши, полученные при переносе хромосом из бластомера в зиготы, не демонстрировали подобных патологических изменений (Мелихова В.С., 2007а).

Эксперименты К.Eggan et al. (2004) доказывают, что способность к репрограммированию утрачивается оплодотворенным овоцитом не полностью, что согласуется с попытками получить ЧЭСК с помощью технологии переноса ядра взрослой соматической клетки. Нормальные оплодотворенные овоциты (замороженные в клиниках экстракорпорального оплодотворения) являются гораздо более доступным и менее этически противоречивым источником для технологии переноса ядра, кроме того, 3-5% из всех человеческих зигот имеют ненормальное количество пронуклеусов после *in vitro* оплодотворения. Эти зиготы не используются в технологии из-за нарушения плоидности, однако они могут использоваться для подобных исследовательских работ.

Исследователи проверили, могут ли анеуплоидные мышинные зиготы поддерживать репрограммирование ядра. Оказалось, что при вступлении в митоз пронуклеусы разрушаются, чрезмерное количество хромосом собирается на единственном веретене в центре зиготы. Когда веретено деления удаляется, хромосомы извлекаются вместе с ним. После переноса хромосом из ЭСК клетки-реципиенты развиваются в бластоцисту и могут быть использованы для получения новых линий эмбриональных стволовых клеток с нормальным набором хромосом. Таким образом, эти результаты позволяют обсуждать получение индивидуальных линий ЧЭСК новым методом, который не лимитируется количеством свежесыведенных овоцитов.

Овоциты, зиготы и мбриональные стволовые клетки обладают способностью к репрограммированию, что свидетельствует о том, что эта активность переходит от неоплодотворенного яйца к доимплантационному зародышу и даже линиям ЭСК, полученным из него. Клетки от одно-, двух-,

четырёх- и восьмиклеточных зародышей могут использоваться в качестве реципиентов для переноса хромосом.

Если клетки из человеческих предимплантационных эмбрионов могут использоваться в качестве реципиентов генетического материала (переноса хромосом), а эмбриональные стволовые клетки, остановленные в митозе, могут использоваться для получения «цитопластов» (энуклеированных клеток) со способностью к репрограммированию, то это в значительной степени может приблизить ученых к получению человеческих ЭСК для моделирования заболеваний и использования в регенеративной медицине (Мелихова В.С., 2007а).

4.9. Терапевтическое клонирование

Метод получения эмбриональных стволовых клеток животных и человека путем переноса ядра соматической клетки в лишённую собственного ядра яйцеклетку стал называться терапевтическим клонированием. Подразумевается, что созданный таким образом материал можно использовать для изготовления запасных органов и тканей. Цена получения одной линии клеток с пересаженным ядром составляет около 200 тысяч долларов США

На этом направлении удаётся обойти моральный запрет на использование даже полученных искусственным путем зародышей, поскольку неоплодотворённую яйцеклетку или ядро соматической клетки вряд ли можно считать будущим зародышем.

Несмотря на то, что уже давно известен факт, что эмбриональные стволовые клетки могут превращаться в любой другой тип клеток, конкретный механизм этого до сих пор не был продемонстрирован. Исследователи еврейского университета Иерусалима смогли графически показать процесс, отвечающий на давний вопрос: стволовые клетки развиваются в нужном русле при помощи селективной активации или селективного подавления генов?

Показано, что эмбриональные стволовые клетки экспрессируют большую часть своего генома «случайным образом». Такая разрешенная экспрессия включает родоспецифические и тканеспецифические гены, некодирующие области генома (которые обычно «безмолвствуют»), а также повторные последовательности генома, которые составляют большую часть генома млекопитающих, но также в обычном состоянии не экспрессируют.

Когда эмбриональные стволовые клетки превращаются в тканеспецифичные клетки, они подвергаются глобальному генетическому сайленсингу. Но пока этого не произойдет, эмбриональные стволовые клетки содержат открытый и активный геном. Возможно, это и является секретом их действия: пока ЭСК не изменились, они могут превратиться в любую необходимую клетку, как только произошел сайленсинг, или генетическое подавление, эта способность теряется.

Дифференцировка – процесс необратимый, точнее, обратимый только на некоторых стадиях. Ей предшествует детерминация – определение клеточной судьбы. Она происходит ещё тогда, когда нет внешних признаков дифференцировки, нет даже характерных для неё белков. И, тем не менее, наступает момент, когда судьба клетки уже определена. Это состояние предопределённости клеточной судьбы носит название детерминации. Она проходит через несколько стадий, и, в конце концов, так называемая терминальная (последняя) стадия детерминации автоматически переходит в дифференцировку. На ранних этапах детерминация лабильна, то есть на неё можно повлиять. Скажем, клетка, детерминированная к развитию в направлении нейробласта, на какой-то стадии под влиянием специфических индукторов ещё может стать глиобластом. Но наступает момент, и детерминация становится стабильной, необратимой, идти обратно она уже не может.

Биолог Август Вейсман ещё в позапрошлом веке предполагал, что по мере дифференцировки разные клетки утрачивают некоторые части хромосом. Теперь известно, что в кодирующей части ДНК никаких преобразований не происходит, но возможны изменения в её «незначательной» части, особенно в так называемых коротких повторяющихся последовательностях (сателлитной ДНК). У дрозофилы есть несколько фракций таких последовательностей, и в разных органах может преобладать та или иная из них, а в некоторых они полностью отсутствуют.

Раньше считали, что это ненужная ДНК, «мусор», но, на самом деле, от сателлитной ДНК многое зависит в функционировании генома. Во-первых, она иногда определяет время включения гена. Это может повлиять на начало образования органа, и он окажется гипертрофированным или недоразвитым. Во-вторых, от наличия повторяющихся последовательностей зависит связывание ДНК с ядерной мембраной, что также отражается на работе генов.

Вставка или выпадение определённых участков генома способны привести к тому, что ДНК свяжется с мембраной в новом месте или, наоборот, оторвется от неё. Известно также, что повторение некоторых триплетов (тринуклеотидов) вызывает различные заболевания, так называемые болезни экспансии. Одно из них – спинно-мозжечковая атаксия – тяжёлое заболевание нервной системы, при котором нарушаются движения больного.

Для удобства экспериментаторов можно без особого труда получить в культуре из самых разных органов (мозг, костный мозг, мышца) культуру взрослых мультипотентных клеток-предшественников (multipotent adult precursor cell – МАРС) путем удаления с помощью магнитных бус клеток с кроветворными маркерами и культивирования с цитокинами клеток, образующих прилипающие колонии. Клональное наращивание этих клеток дает линии МАРС, способные проделывать больше 120 удвоений в культуре

при сохранении нормального кариотипа, нормальной длины теломера, стабильного иммунофенотипа (Matsumura H. et al., 2008).

МАРС-клетки человека, трансплантированные иммунокомпрометированным мышам дифференцируются в клетки крови, костного мозга, селезенки, легких, печени, кишечника и способны к самоподдержанию: при трансплантации вторичным реципиентам наблюдаются такие же дифференцировки, как и у первичных реципиентов (Takahashi K. et al., 2006). МАРС характеризуются наличием ОКТ-4, теломеразы, ростовых факторов сосудистого эндотелия 90VEGF1 и VEGF2. Для индукции остеогенеза из клеток МАРС используют TGF β , BMP-2, bFGF, PDGF; для нейроиндукции – форсколин, инсулин, гидрокортизон (Чертков И.Л. и др., 2005)

Терапевтическое клонирование не является полностью безопасным. Генетические поломки в клетках клонированных животных могут ограничить развитие некоторых технологий терапевтического клонирования. Ученые сравнили транскрипционные профили 10 линий эмбриональных стволовых клеток, одни из которых были получены из оплодотворенной зиготы, а другие – из зигот после переноса ядра. Оказалось, что эти клетки идентичны по сравниваемым параметрам. Таким образом, в отличие от клонированных организмов, у которых обнаруживаются генетические отклонения, у линий ЭСК вне зависимости от способа получения таковая патология отсутствует. Таким образом, получение линий ЭСК для целей терапевтического клонирования с этой точки зрения является более предпочтительным, нежели клонирование целого организма (Brambrink T. et al., 2006).

Эмбриональные стволовые клетки, полученные пересадкой ядер соматических клеток, проложили путь к изучению переноса поведенческих навыков и элементарных физиологических программ у реципиента. С помощью пересадок эмбриональных стволовых клеток человека в сетчатку, гиппокамп, таламус, кору большого мозга достигнута осязаемая «гуманизация» органов чувств и мозга животных с целью отслеживания эффекта воздействия трансплантата на высшие функции центральной нервной системы (Семченко В.В. и др., 2008). Начало было положено передачей характерных навыков пения от перепела цыпленку с помощью пересадки кусочков нейроэктодермы. Границы допустимых вмешательств в реконструктивной физиологии животных еще неотчетливо видны, поскольку не известен конечный результат таких действий (Чертков И.Л. и др., 2005).

Несмотря на все опасения, палата представителей Австралийского парламента утвердила закон, разрешающий терапевтическое клонирование эмбрионов человека. Австралийские ученые получили право специально создавать эмбрионы для научных исследований. Новый закон разрешает ученым, так называемое, терапевтическое клонирование – создание эмбриона методом внедрения ядра соматической клетки пациента в донорскую яйцеклетку. Полученный таким образом эмбрион будет практически полной

генетической копией больного. Полученные в терапевтических целях эмбрионы запрещается имплантировать в матку, их рост необходимо останавливать не позднее 14 го дня деления (Свиридова-Чайлахян Т.А. и др., 2009; Mednovosti.Ru).

4.9.1. Современные подходы к получению пациент-специфичных линий эмбриональных стволовых клеток

Актуальному биомедицинскому направлению в заместительной клеточной терапии – терапевтическому клонированию, которое является наиболее универсальным подходом для получения пациент-специфичных линий эмбриональных стволовых клеток с колоссальными возможностями в поддержании и восстановлении здоровья человека посвящен обзор Т.А.Свиридовой-Чайлахян и соавт. (2009), в котором также представлены альтернативные подходы и тенденции в получении эмбриональных стволовых клеток человека, которые, в отличие от терапевтического клонирования, пока далеки от выхода в клиническую практику. Уникальная ценность ЭСК в лечебных целях определяет серьезную потребность в развитии терапевтического клонирования, одного из самых перспективных биомедицинских направлений в заместительной клеточной терапии в нашей стране.

Основой терапевтического клонирования явились создание клонированной овечки Долли, получение эмбриональных стволовых клеток из бластоцист и примордиальных зародышевых клеток человека. В первом случае убедительно показано для млекопитающих, что если в энуклеированный овоцит ввести ядро соматической клетки взрослого организма, то под влиянием цитоплазмы овоцита ядро такой клетки репрограммируется и способно дать начало развитию эмбриона (клона), геном которого идентичен геному организма – донора ядер. Во втором случае показано, как можно получать и культивировать эмбриональные стволовые клетки человека.

Объединение описанных выше двух важных достижений создает принципиальную возможность получения пациент-специфичных линий эмбриональных стволовых клеток и на их основе прогениторных клеток, детерминированных в определенном направлении (например, клетки гематопозитического ряда), которые, по существу, будут клетками самого пациента и полностью с ним иммуносовместимыми. В этом состоит главный смысл и главная цель терапевтического клонирования.

В настоящее время основными источниками получения стволовых клеток непосредственно для биомедицинских работ являются стволовые клетки из пуповинной крови и стволовые клетки взрослых. Оба источника имеют серьезные ограничения: стволовые клетки пуповинной крови аутогенны только вновь рожденным, а получение стволовых клеток от

самого пациента небезопасно для него. Кроме того, по общему мнению, потенциальные возможности к дифференцировке у этих клеток ниже, чем у ЭСК. Очевидно, что наиболее универсальный и надежный источник получения стволовых клеток человека – с помощью технологий клонирования (Свиридова-Чайлахян Т.А. и др., 2009).

Отдельного внимания заслуживает принципиальный вопрос о возможности клонирования органов. Чрезвычайная сложность органогенеза делает практически нереальным на настоящем уровне знаний создание тех или иных органов в системе *in vitro*. Однако в конце 2011 года Т. Kobayashi и Н. Nakauchi в Университете Токио опубликовали оригинальный протокол получения поджелудочной железы мышей *in vivo* из плюрипотентных стволовых клеток крысы с применением метода комплементации бластоцист (Kobayashi Т., Nakauchi Н., 2011). Авторы использовали линию мышей, несущих мутацию в гомеобоксном гене *Pdx1*. Гомозиготы по данной мутации *Pdx1(-/-)* являются летальными вследствие отсутствия поджелудочной железы, тогда как гетерозиготные мыши *Pdx1(+/-)* жизнеспособны. При скрещивании гетерозиготных особей и тестировании эмбрионов на преимплантационных этапах развития, отобраны гомозиготные бластоцисты *Pdx1(-/-)*, в полость которых была произведена инъекция плюрипотентных стволовых клеток крысы.

Развившиеся химерные мыши были жизнеспособны и имели полноценную поджелудочную железу, сформированную практически полностью из стволовых клеток крысы (исключение составляли кровеносные сосуды и нервные клетки в органе, имевшие химерное происхождение). Полученные животные имели нормальную продолжительность жизни и не демонстрировали никаких признаков диабета. Примечательно также то, что размеры органа оказались «адаптированы» под размер организма мыши. Таким образом, получение органов *in vivo* с использованием метода комплементации бластоцист открывает принципиально новые горизонты в исследовании механизмов органогенеза и в технологиях клонирования органов.

4.9.1.1. Перспективные потребности в терапевтическом клонировании

Можно уверенно утверждать, что перспективные потребности в терапевтическом клонировании неограничены, поскольку этот подход позволяет практически для каждого человека создать собственный банк линий стволовых клеток. Так как эти клетки быстро размножаются, их можно получать в любом количестве. Человек, по существу, станет обладать неограниченным запасом собственных стволовых и прогениторных клеток различной детерминации.

Если основываться на современных представлениях об огромной роли в нормальном функционировании человеческого организма природного пула стволовых клеток, который существенно снижается с возрастом, то становятся совершенно очевидными колоссальные возможности терапевтического клонирования в поддержании и восстановлении здоровья человека в процессе его жизни, в преодолении различных недугов и в продлении его активного возраста (He Q. et al., 2003). Жизненные возможности каждого конкретного человека при этом резко обогащаются.

Сейчас в ряде стран приняты законы, разрешающие исследования с ЭСК человека, хотя морально-этические проблемы, связанные с использованием для этого человеческих эмбрионов, по-прежнему продолжают вызывать в обществе самые острые дебаты (de Wert G. et al., 2003).

Обычно в репродуктивной практике получают примерно 24 овоцита от каждой женщины-клиента и лишь 2-4 эмбриона используют затем для имплантации в надежде, что один из них будет нормально развиваться в ходе беременности. Многие эмбрионы, остающиеся после искусственного оплодотворения, будут разрушены в любом случае, даже спустя годы хранения в криобанках. Менее 3% таких эмбрионов доступны сейчас для исследований (Hoffman D. I. et al., 2003).

В то же время, специальный анализ, проведенный в США, Канаде, Англии, Австралии и в ряде других стран показал, что пациенты центров репродукции в преобладающем большинстве предпочли бы передать остающиеся овоциты и эмбрионы в дар для научных исследований, в том числе и для получения стволовых клеток (Lyerly A.D. et al., 2007; Hug K., 2008; Nelson E. et al., 2008; Provoost V. et al., 2009).

В марте 2009 года в США законодательно разрешены исследования с эмбрионами и эмбриональными стволовыми клетками человека в биомедицинских целях с проведением соответствующих клинических испытаний (Hayden E.C., 2009), хотя фактически эксперименты в этом направлении начаты в 2006 году в Гарвардском университете. Многомиллионные проекты по созданию клонированных человеческих эмбрионов с целью получения эмбриональных стволовых клеток запущены также и в Австралии.

С учетом приведенных выше фактов не вызывает никаких сомнений, что терапевтическое клонирование в ближайшее время станет ведущим направлением в заместительной клеточной терапии и биомедицинской практике в мире. Уникальная ценность ЭСК в лечебных целях определяет серьезную потребность в развитии терапевтического клонирования и в нашей стране. Очевидно, что законодательное разрешение в России на проведение таких научно-исследовательских работ в определенных жестких этических рамках является сейчас важнейшей и насущной потребностью. Необходимо заметить, что терапевтическое клонирование человека и репродуктивное клонирование это принципиально разные по своим целям направления, и, безусловно, репродуктивное клонирование человека должно быть под

строгим запретом по фундаментальным биологическим причинам, не говоря уже о возникающих при этом сложных этических, правовых и социальных проблемах (Свиридова-Чайлахян Т.А. и др., 2009).

4.9.1.2. Мировые тенденции развития терапевтического клонирования

Огромные возможности технологий терапевтического клонирования пока продемонстрированы на животных модельных объектах. Первая работа по терапевтическому клонированию опубликована в 2000 году и была выполнена на мышах (Rideout W.M. et al., 2002). В работе показано, что линии ЭСК из клонированных эмбрионов состоят из клеток с такими же плюрипотентными свойствами, как и обычные эмбриональные стволовые клетки. Затем появились десятки таких работ и сделаны удачные попытки при использовании технологии клонирования корректировать имеющиеся у экспериментальных животных патологии, в частности, комбинированный иммунодефицит (Rideout W.M. et al., 2002). Тем самым продемонстрированы серьезные возможности сочетания терапевтического клонирования с генной терапией для успешного лечения различных генетических заболеваний.

К настоящему времени фундаментально-научные и технологические аспекты не создают преград для терапевтического клонирования (Свиридова-Чайлахян Т.А. и др., 2005; Trounson A. et al., 2003; Wobus A M. et al., 2005; Trounson A., 2006). И хотя в мире насчитывается уже около 500 линий эмбриональных стволовых клеток человека, однако ни одна из них не получена технологиями клонирования – методом пересадки ядер. Две сенсационные публикации в журнале «Science» (Hwang W.S. et al., 2004, 2005) южнокорейских ученых по получению для 11 тяжелобольных пациентов индивидуальных линий эмбриональных стволовых клеток, оказались недостоверными. Редакция журнала опубликовала заявление об отзыве этих двух работ и принесла извинения читателям и специалистам, потратившим время и ресурсы на воспроизведение данных экспериментов (Kennedy D., 2006).

Имеется сообщение (Revazova E.S. et al., 2007) о получении пациент-специфичной линии из активированных партеногенетических человеческих овоцитов, содержащей гистосовместимые стволовые клетки для донора овоцитов – потенциальной пациентки, в лечении которой уже возможно использование аутогенных клеток без реакции иммунного отторжения. Другим достижением является образование клонированных человеческих эмбрионов с ядрами фибробластов, которые развились до стадии бластоцисты, но при этом линии ЭСК из них не создавали (French A.J. et al., 2008; Свиридова-Чайлахян Т.А. и др., 2009).

4.9.1.3. Альтернативные подходы в получении пациент-специфичных линий эмбриональных стволовых клеток

Одновременно в мире ведется интенсивный поиск альтернативных возможностей для получения пациент-специфичных линий эмбриональных стволовых клеток в биомедицинских целях. Одна из возможностей состоит в пересадке ядер соматических клеток человека в овоциты животных. Стремительно возросший интерес к терапевтическому клонированию в лечении различных заболеваний требует получения эмбриональных стволовых клеток в больших количествах. Однако, даже в условиях законодательного благоприятствования, человеческих овоцитов и зародышей для этого всегда будет очень ограниченное количество, а их получение – дорогостоящим.

Нехватка человеческих овоцитов, необходимых в исследовательских целях, может быть восполнена использованием овоцитов животных, которые более доступны. Гибридные гетероплазмичные эмбрионы с геномом человека и смешанной цитоплазмой человека и животного представляют собой привлекательную и удобную модельную систему для решения многих фундаментально–практических вопросов терапевтического клонирования. При проведении исследований строго запрещено имплантировать полученные гибридные эмбрионы в матку человека или животного, а также длительно выращивать их *in vitro* (более 14 суток).

Первая успешная работа в этом направлении принадлежит группе китайских ученых (Chen Y. et al., 2003), которые методом переноса ядер соматических клеток человека (фибробластов) в энуклеированные кроличьи овоциты получили гибридные реконструированные эмбрионы и затем линии эмбриональных стволовых клеток. Тщательный анализ показал, что эти ЭСК фенотипически сходны с обычными человеческими эмбриональными стволовыми клетками (включая способность к разнообразным клеточным дифференцировкам).

Таким образом, оказалось возможным получать линии стволовых клеток человека без участия человеческих овоцитов. Эти же исследователи затем осуществили перенос ядер фибробластов человека в энуклеированные коровьи овоциты (Li F. et al., 2008) и показали, что и в таких гибридах наблюдается перепрограммирование ядер клеток человека с соответствующей активацией эмбриональной генной экспрессии. Гибридные эмбрионы развивались до поздних предимплантационных стадий, что важно для генерации в дальнейшем ЭСК.

Проведение аналогичных исследований было разрешено в Англии. Однако все усилия повторить работу китайских ученых оказались безуспешными. Не удалось методом межвидовой пересадки ядер добиться развития таких же реконструированных гибридных эмбрионов человека и

животных до стадии получения бластоцист и эмбриональных стволовых клеток (Jingjuan J. et al., 2005; Vogel G., 2006).

Аналогичные попытки межвидовой пересадки ядер человека, предпринятые в США, оказались тоже неудачными (Chung Y. et al., 2009). На основании большой серии опытов по переносу ядер соматических (кумулясных) клеток человека в овоциты человека и различных животных: коров, кроликов и мышей – показано, что в гибридах человека и животных не достигается соответствующего репрограммирования ядер, как в клонированных человеческих эмбрионах, у которых паттерн генной экспрессии практически идентичен с нормальными человеческими эмбрионами. Особенно критично, что в гибридных эмбрионах отсутствовала экспрессия генов плюрипотентности, что необходимо для получения стволовых клеток.

По мнению ряда исследователей, дефекты в развитии гибридов человека и животных могут быть связаны не только с недостаточным перепрограммированием эпигенетического статуса соматических ядер человека, но и с полной несовместимостью ядерного генома человека и митохондриального генома животного (Bowles E.J. et al., 2007). Реконструированные гибридные зародыши выживают непродолжительное время только за счет человеческих митохондрий, поскольку ядра соматических клеток человека, как правило, переносятся в овоциты животного вместе с цитоплазмой (Bowles E.J. et al., 2007).

На основании всех полученных данных сделан вывод, что овоциты животных не пригодны для использования в качестве реципиентов ядер человеческих клеток, и получение эмбриональных стволовых клеток человека из таких зародышей практически невозможно (Chung Y. et al., 2009).

Другим подходом для создания пациент-специфичных плюрипотентных стволовых клеток является индукция дедифференцировки соматических клеток с помощью самих ЭСК, что было показано методом соматической гибридизации сначала на мышах (Tada M. et al., 2001), а затем с эмбриональными стволовыми клетками человека (Cowan C.A. et al., 2005; Yu J. et al., 2006). Стволовые клетки при слиянии с соматическими клетками являются поставщиками факторов, требуемых для эпигенетического репрограммирования генома соматических клеток с соответствующей индукцией плюрипотентных свойств и характеристик (Do J.T. et al., 2004; Strelchenko N. et al., 2006).

Показана возможность репрограммирования ядер соматических клеток с помощью экстракта эмбриональных стволовых клеток (Taranger S.K. et al., 2005) и предприняты попытки селективной элиминации ЭСК-хромосом (Matsumura H. et al., 2007, 2008). Однако удаление всех хромосом технически пока мало достижимо, и рассматриваемый способ получения стволовых клеток в целом далек от выхода в терапевтическую практику.

Наиболее многообещающим альтернативным подходом для создания пациент-специфичных линий из соматических клеток в биомедицинских

целях является получение ЭСК-подобных клеток или индуцированных плюрипотентных линий стволовых клеток (iPS). Это новое направление исследований в заместительной клеточной терапии, начало которому положила работа ученых из Японии на мышах по перепрограммированию фибробластов до статуса, аналогичного плюрипотентному (Takahashi K. et al., 2006). Вскоре возможность такой трансформации показали для фибробластов человека (Nakagawa M. et al., 2008).

Генетическую модификацию фибробластов проводили с помощью ретровирусной трансфекции четырех ключевых факторов плюрипотентности: Oct3/4, Sox2, Klf4, с-Мус, и последующая экспрессия этих генов индуцировала репрограммирование соматических клеток с возвратом к плюрипотентному состоянию. Эффективность такого подхода оказалась очень низкой. Обнаружено также, что использование вирусных векторов может приводить к малигнизации iPS-клеток. Эти работы стали сенсацией (Yamanaka S., 2007; Zaehres H. et al., 2007; Nishikawa S.I. et al., 2008).

Последовала серия исследований с факторами индукции и был предпринят активный поиск других способов введения генов в соматические клетки (не прибегая к ретровирусам) с минимизацией модификации генома (Aasen T. et al., 2008; Huangfu D. et al., 2008; Kim J.B. et al., 2008; Lowry W.E. et al., 2008; Park I.H. et al., 2008; Feng B. et al., 2009). В результате на мышах выявлена возможность безопасного способа репрограммирования клеток с использованием транспозонов и всего одного фактора Klf4 (Kaji K. et al., 2009).

Тем не менее, некоторые авторы считают, что iPS-клетки преждевременно считать адекватной альтернативной заменой эмбриональных стволовых клеток для регенеративной терапии (Liu S.V., 2008). В биомедицинских целях необходимо репрограммировать собственные гены клеток вместо добавления новых копий и только технологии терапевтического клонирования предоставляют уникальную возможность такого репрограммирования ядер соматических клеток. Обратимость программы экспрессии генов под воздействием цитоплазмы овоцитов, возврат к паттерну эмбриональной экспрессии в соматических донорских ядрах позволяют в настоящее время рассматривать реконструированные эмбрионы человека как основной источник получения пациент-специфичных линий ЭСК (Свиридова-Чайлахян Т.А. и др., 2009).

4.9.1.4. Состояние исследований по терапевтическому клонированию в России

Несмотря на бум по поводу больших возможностей ЭСК в лечении различных заболеваний, работы по терапевтическому клонированию в России практически не ведутся. В первую очередь это объясняется отсутствием законодательной базы для проведения исследований с

использованием овоцитов и эмбрионов человека. С принятием таких законов для России существует реальная возможность очень быстрого развития терапевтического клонирования. В нашей стране имеются эффективные клеточные технологии получения реконструированных эмбрионов методом трансплантации ядер. По-существу, основы современных технологий переноса ядер соматических клеток, сочетающих микрохирургию и электрослияние, впервые разработаны у нас в 80-х годах прошлого столетия (Чайлахян Л.М. и др., 2001). Также имеются эффективные технологии получения линий человеческих эмбриональных стволовых клеток (Киселев С.Л. и др., 2006). и клеток с индуцированной плюрипотентностью (iPS) (Медведев С.П. и др., 2010; Lagarkova M.A. et al., 2010; Philonenko E.S. et al., 2011).

Реализовывать задачи терапевтического клонирования возможно на основе центров репродукции, которые помимо их прямого предназначения могут стать центрами по получению линий эмбриональных стволовых клеток, в первую очередь, непосредственно для женщин-пациенток данного центра и любых членов их семей. Примером такого центра в России может служить Красноярский центр репродуктивной медицины, где успешно развивается научное направление, связанное с получением и характеристикой линий эмбриональных стволовых клеток человека (Еремеев А.В. и др. 2009). Можно ожидать, что с развитием терапевтических технологий получение собственных эмбриональных стволовых клеток станет доступно каждому человеку.

Необходимо осуществлять тесное сотрудничество центров репродукции с соответствующими научно-исследовательскими лабораториями, ориентированными на решение фундаментальных проблем и на разработку новых технологий. К подобным технологиям можно отнести реконструкцию эмбрионов с применением неинвазивных оптико-лазерных приемов микроманипулирования в целях терапевтического клонирования и заместительной клеточной терапии (Karmenyan A. et al., 2008). Разработка таких приемов приведет к появлению нового класса микроманипуляционной аппаратуры, совмещающей различные оптико-лазерные микроинструменты (оптический пинцет, лазерный скальпель) с компьютеризированным управлением.

При соответствующей последовательной направленной научно-организационной работе в отношении развития в нашей стране терапевтического клонирования, Россия может достичь в обозримом будущем зарубежного уровня в этой области биомедицинских исследований (Свиридова-Чайлахян Т.А. и др., 2009).

4.10. Потомство, полученное с использованием «искусственных» сперматозоидов, выделенных из эмбриональных стволовых клеток

Эксперименты по выделению и характеристике половых клеток из эмбриональных стволовых клеток позволяют исследовать биологические процессы в гаметях и гаметогенез, а также стать одним из способов лечения бесплодия в будущем (Лопатина Т.В., 2006а). Показано формирование из эмбриональных стволовых клеток овоцитов (Hubner K. et al., 2003) и сперматозоидов (Toyooka Y. et al., 2003; Lacham-Kaplan O. et al., 2006). Однако ни одна группа до сих пор не продемонстрировала функциональность выделенных гамет, то есть их способность давать нормальное потомство. Полученные путем оплодотворения «искусственными» гаметами бластоцисты животным не имплантировали.

Группа К. Nayernia из Georg-August University (Guttingen, Germany) впервые показала способность сперматозоидов, выделенных из эмбриональных стволовых клеток мыши, к оплодотворению и развитию взрослых животных из полученных зародышей (Nayernia R. et al., 2006).

Для определения функциональной активности полученных клеток ученые использовали две генетические конструкции с промоторами генов, характерных для премейотических гаплоидных мужских половых клеток. Под их контролем запускалась экспрессия флуоресцентных белков: зеленого и красного соответственно. Благодаря таким генетическим меткам, исследователи могли выделить сперматогониальные клетки в культуре эмбриональных стволовых клеток. Эти гены вносили в ЭСК в культуре и культивировали до 2 месяцев. В процессе культивирования использовался коктейль растворимых факторов, которые способствовали выживанию и самообновлению мышинных половых клеток. После культивирования в такой среде до 60% клеток, экспрессирующих трансген (а значит, коммитированных по пути развития мужских половых клеток), сортировались и переносились в базовую среду без факторов дифференцировки. Через 2 месяца клетки подвергали повторной сортировке на основе экспрессии обоих трансгенов. Таким путем исследователям удалось вывести 2 сперматогониальные линии – SSC7 и SSC12.

Клетки были способны формировать эмбрионидные тельца и экспрессировали белки, характерные для сперматогониев. Для определения функциональной активности полученных клеточных линий их пересаживали в семенник мышам (второй служил в качестве контрольного), которым предварительно была проведена абляция половых клеток. У 2 из 10 проанализированных животных в просвете семенного канальца, а также в его стенке, обнаружены картины нормального сперматогенеза. Однако подвижность полученных клеток была значительно снижена по сравнению с положительным контролем. Происхождение постмейотических клеток в просвете канальца подтверждалось активной флуоресценцией трансгенных

белков. У пяти мышей зафиксировано образование тератом после трансплантации.

Внутрицитоплазматическая инъекция клеток полученных линий в неоплодотворенный овоцит мышей дикого типа приводила к последующему выбросу полярного тельца и формированию пронуклеусов. Двухклеточные эмбрионы, полученные таким образом, имплантировали в яйцевод псевдобеременной самки. Из 65 перенесенных эмбрионов родилось 12 мышат. По сравнению с мышатами дикого типа, мышата, полученные искусственным путем, были либо меньше, либо больше по размеру и погибали в течение 5 месяцев. Клетки, несущие трансген, были обнаружены в семенниках некоторых из потомков (Nayernia R. et al., 2006).

Несмотря на низкую эффективность переноса, рождение слабых и дефектных детенышей, образование тератом после трансплантации клеток, авторы впервые продемонстрировали возможность рождения потомства, полученного после оплодотворения *in vitro* «искусственно» полученными гаметами из ЭСК. Таким образом исследователи доказали что мужские гаметы, полученные из эмбриональных стволовых клеток, полностью функциональны.

При усовершенствовании методики получения половых клеток из ЭСК и увеличении эффективности оплодотворения и рождения здоровых детенышей, откроются новые перспективы использования данной технологии в биологии и медицине. Прежде всего, разработанная система может служить прекрасной моделью изучения дифференцировки гамет. Возможность выделения гамет из эмбриональных стволовых клеток может решить проблему некоторых форм бесплодия. Кроме того, выделение функциональных мужских и женских гамет из одной линии эмбриональных стволовых клеток позволит полностью автономно поддерживать и обновлять эту линию через создание новых бластоцист. Тем не менее, развитие таких технологий одновременно порождает и ряд этических вопросов (Мелихова В.С., 2006).

4.11. Сомнения в клонировании животных

4.11.1. Сомнения в чистоте клонирования

Известные биологи высказывают серьезные сомнения в чистоте эксперимента с овцой Долли. Критике подвергнут научный отчет, опубликованный Яном Уилмутом и его коллегами из Рослинского института в Шотландии, где появилась на свет Долли.

Скептики утверждают, что авторы отчета не сумели доказать, что Долли и ее «мать» обладают одинаковой генетической структурой. А без этого невозможно установить, действительно ли Долли является клоном взрослого животного. Сомнения Нобелевского лауреата профессора Уолтера Гилберта из Гарвардского университета США основываются на том, что клетки для

создания Долли, взяты у овцы, умершей за 3 года до ее рождения. Клетки были заморожены для других целей, поэтому невозможно напрямую сравнить наследственный материал Долли с ее живым клоном.

Специалист в области молекулярной генетики из университета Рокфеллера в Нью-Йорке профессор Нортон Зиндер, не исключает, что родительницей знаменитой овцы стала «заблудившаяся» клетка зародыша. Известны случаи, когда эмбриональные клетки попадали в кровь беременных животных. "Клонирование Долли было единственной удачей из восьми-девяти сотен попыток. Во время эксперимента могли произойти любые вообразимые и невообразимые ошибки".

Высказываются и более основательные сомнения. Хотя каждая отдельная клетка несет в себе полную наследственную информацию, большинство генов быстро «отключается». Клетки специализируются и из клетки печени, например, не сможет получиться клетка мозга.

4.11.2. Происхождение Долли не обладает стопроцентной генетической достоверностью

Профессор Клаус Раевски, директор Института генетики Кельнского университета, и его коллега Вернер Мюллер считают, что доказательство происхождения Долли не обладает стопроцентной генетической достоверностью. Они не исключают путаницу с исходными клетками. В целом, шотландские создатели Долли в течение нескольких месяцев проделали 834 опыта по клонированию, используя три различных типа клеток, размеры которых составляют всего несколько тысячных долей миллиметра. Возможно и «загрязнение» клеток вымени. В чашке Петри, очевидно, могли плавать и другие вещества. Сомнения могла бы устранить только вторая Долли, то есть успешное повторение шотландского эксперимента.

4.11.3. Генетические поломки в клетках клонированных животных

Генетические поломки в клетках клонированных животных могут ограничить развитие некоторых технологий терапевтического клонирования. Ученые сравнили транскрипционные профили 10 линий эмбриональных стволовых клеток, одни из которых были получены из оплодотворенной зиготы, а другие – из зигот после переноса ядра. Оказалось, что эти клетки идентичны по сравниваемым параметрам. Таким образом, в отличие от клонированных организмов, у которых обнаруживаются генетические отклонения, у линий ЭСК вне зависимости от способа получения таковая патология отсутствует. Таким образом, получение линий эмбриональных стволовых клеток для целей терапевтического клонирования с этой точки

зрения является более предпочтительным, нежели клонирование целого организма (Brambrink T. et al., 2006).

4.11.4. Иммунологическая совместимость клона и клетки-донора ядра

Считается, что создание индивидуальных для каждого пациента линий эмбриональных стволовых клеток с помощью метода переноса ядра соматической клетки в энуклеированный овоцит, позволит избежать проблемы иммунного отторжения. Действительно, клонированные ЭСК имеют идентичный реципиенту генетический материал ядра и, следовательно, идентичные антигены главного/минорного комплекса гистосовместимости ядерного происхождения. Полная совместимость по антигенам МНС I-II классов исключает прямое распознавание Т-лимфоцитами и, следовательно, реакции острого отторжения.

С другой стороны, митохондриальная ДНК клонированных эмбриональных стволовых клеток и клеток реципиента не идентичны. Митохондриальный геном человека содержит гены не менее 13 белков (Anderson S. et al., 1981). Для этих генов характерен выраженный полиморфизм (Ingman M. et al., 2006), что, по-видимому, обусловлено несовершенством механизмов репарации, отсутствием гистонов и присутствием свободных радикалов кислорода – побочных продуктов аэробного дыхания.

Таким образом, митохондриальные белки клонированных эмбриональных стволовых клеток и клеток реципиента могут иметь значительные структурные различия. Подобные структурные различия, в свою очередь, могут обуславливать реакцию отторжения по механизму непрямого распознавания. Несмотря на проведенные многочисленные исследования, представления о роли антигенов митохондриального происхождения в реакциях отторжения в настоящий момент имеют преимущественно теоретический характер и требуют тщательного изучения.

Первые исследования, проведенные группой R. Lanza et al. (Tomii R. et al., 2005), показали, что трансплантация клонированных гемопоэтических стволовых клеток не сопровождается какой-либо видимой реакцией иммунного отторжения. Исследованию иммунологической совместимости пары клонированное животное/линия клеток, являющихся источником ядра, посвящена недавно опубликованная в *Biochemical and Biophysical Research Communications* работа японской группы A. Shimada.

В исследовании использовались преадипоцитарные клеточные линии преадипо-1 и преадипо-2, полученные из адипоцитов жировой ткани разных (аллогенных по отношению друг к другу) свиней путем дедифференцировки (Yagi K. et al., 2004; Tomii R. et al., 2005). Ранее ядра клеток этих линий использовали для клонирования 2 свиней – клон-РА1 и клон-РА2, соответственно (Tomii R. et al., 2005). Преадипоциты обеих линий

маркировали витальным красителем. Окрашенные клетки пересаживали в кожу клонированных животных в количестве 1,0-1,4 млрд. (сингенная и аллогенная трансплантация). Через 3 недели фрагменты кожи в местах введения резецировали, подвергали всестороннему гистологическому исследованию.

Гистологический анализ показал, что клетки сингенных трансплантатов располагались в виде скоплений, в составе которых обнаружено незначительное количество некротического дебриса. Большинство меченых клеток имело первоначальную фибробластоподобную морфологию. Эта клеточная популяция была представлена адипоцитами (жировые включения в цитоплазме). Однако, меченые адипоциты не обнаружены в 35-40% сингенных трансплантатов. Клетки аллогенных трансплантатов также располагались в виде скоплений, среди которых не выявлялся некротический дебрис. Во всех фрагментах кожи меченые клетки имели только однотипную фибробластоподобную морфологию.

Таким образом, авторы не наблюдали реакции острого отторжения не только для сингенных, но и для аллогенных преадипоцитов. Отсутствовала и лимфоидная инфильтрация трансплантатов. С другой стороны, исследуемые клетки дифференцировались в адипоциты только при введении сингенному реципиенту. Остается не понятным, обусловлено ли последнее иммунной реакцией реципиента или имела место разновидность феномена «аллогенной ингибиции» (Петров Р.В., 1973). Следует отметить, что использованная экспериментальная модель, в целом, оказалась неудачной для изучения совместимости клонированных клеток, так как не обнаружено признаков реакции иммунного отторжения аллогенного трансплантата. Причины последнего остаются неясны. Возможно, преадипоциты сами обладают слишком малой иммуногенностью или имел место очень короткий период наблюдения.

Таким образом, проблемы иммуногенности клонированных клеток и роль митохондриальных антигенов в индукции «реакции хозяин против трансплантата» требуют дальнейшего изучения (Сергеев В.С., 2006).

4.11.5. Сравнительное геномное исследование клонированных и нормальных эмбрионов

Технология переноса соматического ядра в энуклеированный овоцит имеет большое значение для биомедицины и сельского хозяйства, так как это уникальный способ получения генетически идентичных родительским клеткам или животного-клона. Однако, из такого эмбриона (nuclear transfer – NT-эмбрион) отмечается крайне низкая частота рождения жизнеспособного животного. Как правило, еще в раннем эмбриональном развитии наблюдаются значительные нарушения в ткане- и органогенезе, несовместимые с жизнью. И хотя уже получено немало клонированных животных различных видов, полностью контролировать процесс и

направленно увеличивать его эффективность пока не удастся. Одной из основных причин низкой эффективности технологии считается нарушение эпигенетического контроля работы генов, вследствие этого – неправильное развитие эмбриона. Тем не менее, достоверно показано репрограммирование соматического ядра при его переносе, и удачные случаи клонирования доказывают изменения в генной активности и «снятие» эпигеномной информации.

Проведена работа по сравнению экспрессии генов в нескольких NT-эмбрионах коров на стадии бластоцисты, с соматическими клетками-донорами ядер и с нормально оплодотворенными бластоцистами. Анализ более 5000 тысяч генов, проведенный при помощи микрочипов, показал, что экспрессия генов в NT-эмбрионах сильно отличается от соматических клеток-доноров и минимально отличается от нормальных бластоцист. Это доказывает, что перенесенные в ооциты ядра претерпевают значительное перепрограммирование на стадии бластоцисты, и проблемы, возникающие при развитии тканей и органов из NT-эмбрионов, возможно, связаны с ошибками этого феномена, значение которых увеличивается в процессе органогенеза.

При сравнении картины транскрипции удалось выявить 29% генов, по-разному экспрессирующихся в NT-эмбрионах и соматических клетках-донорах ядер. Эти гены относятся к следующим сигнальным путям: окислительное фосфорилирование, клеточный цикл, синтез АТФ, цикл трикарбоновых кислот, метаболизм пуринов, пирувата, гликолиз и глюконеогенез, апоптоз.

В NT-эмбрионах проанализировали 94 гена, которые экспрессируются в этих клетках на высоком уровне. Из них 23 гена значительно сильнее экспрессировались в исследуемых образцах, по сравнению с донорными соматическими клетками. Среди них – ранее описанные *ODC1*, *PECAM1*, *CCNE1* – гены, специфичные для эмбриональных стволовых клеток.

Таким образом, принимая во внимание различия в уровне экспрессии описанных генов, можно предположить, что ядро соматической клетки претерпевает значительное перепрограммирование после переноса в яйцеклетку.

Профиль экспрессии генов сравнивали у NT-эмбрионов и эмбрионов, полученных вследствие искусственной инсеминации (artificial insemination – AI-эмбрионы) и искусственного оплодотворения (*in vitro* fertilization – IVF-эмбрионы). Оказалось, что активность генов в NT-эмбрионах более схожа с таковой в AI-эмбрионах, тогда как различия между NT- и IVF-эмбрионами более значительные. Интересно, что при сравнении индивидуальных эмбрионов внутри группы более однородными являются NT-эмбрионы, а IVF-эмбрионы – наиболее разнородные. Сходная картина генной экспрессии у NT-эмбрионов также подтверждает механизм перепрограммирования ядра. Различия между IVF-эмбрионами могли возникнуть вследствие культивирования или генетических различий матерей-доноров яйцеклеток.

Несмотря на близкую генную экспрессию между NT- и AI-эмбрионами, 50 генов (около 1%) отличаются по уровню транскрипции. Среди них 8 экспрессируются только в NT-эмбрионах, а 17 – только в AI-эмбрионах. Возможно, эти гены связаны с различиями развития *in vitro* и *in vivo*.

Для некоторых из этих генов описаны функции, например, *TFAP2A* необходим для формирования нервной трубки, развития сердечной мышцы (Brewer S. et al., 2004), а *MEIS2* и *DUSP6* необходимы для развития конечностей (Kawakami Y. et al., 2003), *folate receptor 1 (FOLR1)* играет роль в транспортной системе между материнским и эмбриональным организмами. Все эти гены транскрибируются на низком уровне в NT-эмбрионах и, возможно, являются причиной нарушений развития клонированных животных.

С другой стороны, множество аномалий развития клонированных животных могут быть вызваны нарушениями импринтинга. Исследователи проанализировали экспрессию 21 гена, импринтированных у мыши и человека. Среди этих генов 20 экспрессировались одинаково у NT-, AI- и IVF-эмбрионов. И только один ген – *Cd81* – активный в плаценте мыши, по-разному экспрессировался у NT- и AI-эмбрионов. Возможно, это нарушение послужило причиной для, так называемого *large offspring syndrome* (синдрома крупного потомства), часто наблюдаемого в случае NT и связанного, как правило, с потерей импринтинга гена *Igf2r*. Здесь стоит отметить, что регистрируемое увеличение частоты рождения детей с болезнями импринтинга после применения методов искусственного оплодотворения также обусловлено нарушениями эпигенетического статуса импринтированных генов (Лебедев И.Н., Пузырёв В.П., 2007). Нормальная экспрессия других импринтированных генов подтверждает теорию о перепрограммировании ядра.

Нарушение экспрессии генов, сцепленных с X-хромосомой, наблюдалось у клонированных умерших животных и NT-эмбрионов. Но из 123 известных человеческих генов, сцепленных с X-хромосомой, не нашли ни одного, экспрессирующегося по-разному в AI- и NT-эмбрионах. Высказано предположение, что ключевое событие в раннем развитии – инактивация X-хромосомы – возможно, у коров происходит позже, чем те сроки развития, во время которых проводили исследования.

При анализе генов, участвующих в регуляции метилирования и модификации хроматина, не удалось выявить различия в экспрессии генов по сравнению с нормальными эмбрионами. На основании полученных данных сделан вывод, что перепрограммирование соматического ядра, перенесенного в цитоплазму яйцеклетки, касается и эпигенетических изменений.

Из 434 генов, непосредственно вовлеченных в процессы раннего развития, удалось выявить лишь 5 дифференциально экспрессирующихся между NT- и AI-эмбрионами, тогда как у IVF-эмбрионов таких генов 14 по сравнению с NT, и 24 по сравнению с AI-эмбрионами. Эти результаты

показывают, какое влияние имеет для раннего развития искусственное оплодотворение. Три гена были активны исключительно у AI-эмбрионов (*AKAP11*, *CCL2* и *PPAP26*). Возможно, они отвечают за успешное развитие нормально оплодотворенных эмбрионов или активируются в ответ на условия развития *in vivo*.

Подводя итог работы, следует сказать, что ученым выявлено более 300 генов, которые не меняют своей активности в трех исследованных типах эмбрионов, что может свидетельствовать об их первостепенной важности на ранних этапах развития. Кроме этого, достоверно показано, что характер экспрессии генов при переносе соматического ядра в яйцеклетку на ранних этапах более близок к таковому в нормально оплодотворенных эмбрионах (AI-эмбрионы). Анализ, проведенный на стадии бластоцисты, показал, что соматическое ядро претерпевает репрограммирование, и экспрессия генов меняется в соответствии с генной активностью раннего эмбриона.

С целью выяснения генетических различий между клонированными и нормальными эмбрионами мыши на стадии бластоцисты проведена аналогичная работа и в лаборатории R. Jaenisch (2006). Ученые подтвердили, что по генной активности и по развитию на этой стадии эмбриональные стволовые клетки из этих эмбрионов абсолютно идентичны и имеют одинаковый потенциал для использования в терапевтических целях (Brambrink T. et al., 2006). В то же время, ограниченные сроки развития, при которых проводились исследования, не дают права утверждать, что это репрограммирование достаточно для дальнейшего развития организма (Лопатина Т.В., 2006).

4.11.6. Недостаточность репрограммирования ядра гемопозитической стволовой клетки при его переносе

Появились многочисленные работы, в которых показано, что при терапевтическом клонировании в трансплантированных ядрах соматических клеток функции не менее 4% генов существенно нарушены. Выяснилось также, что в настоящее время не удастся добиться полного репрограммирования ядер соматических клеток, необходимого для нормального индивидуального развития при помещении их в другую цитоплазму. Не удастся стереть метилирование ряда генов. В результате необходимая для нормального развития зародышей нормальная их функция не восстанавливается. Следовательно, такие ядра неспособны обеспечить развитие физически полноценных зародышей. Особенно существенно то, что в трансплантированных ядрах соматических клеток не удастся полностью реактивировать гены, родственные *Oct4*, одному из главных маркеров эмбриональных стволовых клеток, которые и планируется использовать в качестве исходного материала (Корочкин Л.И., 2006; Лопатина Т.В., 2006в; Dean W. et al., 2001; Young-Kook K. et al., 2001).

Глава 5. БЕЗОПАСНОСТЬ ГЕННЫХ И КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

5.1. Мнение специалистов

В связи с тем, что по всему миру широко начинались клинические испытания методов клеточной терапии, использующие собственные стволовые или прогениторные клетки пациента при некоторых негематологических заболеваниях, ряду специалистов редакцией журнала «Клеточная терапия и тканевая инженерия» был задан вопрос, каких осложнений и побочных эффектов стоит опасаться и ожидать и какую профилактику применять при таком методе терапии.

В.А.Козлов, академик РАМН, доктор медицинских наук, профессор, директор НИИ Клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск) рассказал, что при использовании метода клеточной терапии для лечения цирроза печени, атрофии зрительного нерва, вакуумной дистрофии, гипоксии нижних конечностей и инсультов никаких осложнений, за исключением цирроза печени, при котором бывает кратковременная температурная реакция, не наблюдалось. Температурная реакция проходит за один – два дня, дополнительная терапия не требуется.

Н.А.Онищенко, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующая лабораторией биотехнологии стволовых клеток ГУ НИИ ГиИО (Москва) считает, что прежде всего следует опасаться отсутствия того эффекта, на который рассчитывал врач. Такое «непредвиденное осложнение» ожидает тех, кто не учитывает в своей работе патофизиологических закономерностей развития адаптационных реакций и кто не знает, что практически у всех больных, особенно с длительными хроническими заболеваниями каких-либо органов (не относящихся к системе крови), развивается гемопоэтический стресс-синдром, который является частью общего адаптационного синдрома. При тяжелой степени выраженности гемопоэтического стресс-синдрома не развивается компенсаторная перестройка работы гемопоэтических стволовых клеток. Поэтому у тяжелых больных обычно имеет место дисфункция иммунной системы и анемия. Крайне тяжелая степень выраженности дефицита функции поврежденного органа не может быть компенсирована аутологичными клетками костного мозга, так как процессы восстановительной регенерации у таких больных уже малоэффективны и паренхима органа достигла критической массы.

В.Б.Хватов, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, руководитель отдела трансфузиологии, консервирования тканей и культуры клеток НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского (Москва) обращает внимание на то, что, к сожалению, недостаточно изучено влияние

самого процесса культивирования, необходимого для «масштабирования» аутоклеточной популяции стволовых клеток на геном стволовых клеток. Так как возможна полноценная и регулярно анализируемая характеристика различных клеточных линий, то побочные эффекты можно прогнозировать и устранять. Проблема внедрения «клеточной трансплантации и тканевой инженерии» в клиническую практику требует широкомасштабных систематических исследований, включающих защиту трансплантированных клеток от гибели и создания условий для проявления ими своих качеств.

О.А.Майорова, доктор медицинских наук, профессор, директор Банка стволовых клеток департамента здравоохранения г. Москвы считает, что для профилактики побочных эффектов клеточной терапии важно помнить о возможных осложнениях, связанных с нарушениями в приготовлении клеточного материала: стерильности, отмывания полученных клеток, оценки генетической стабильности культур после каждого пассажа, что можно избежать, если исследования будут проводиться в крупных научно-исследовательских центрах, получивших признанные в мире аккредитации (например, FACT, EFI, JACIE), работающих по принципам GMP и GTP по всем правилам проведения клинических исследований (мультицентр, двойное слепое рандомизированное исследование).

Г.П.Пинаев, доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, руководитель отдела клеточных культур НИИ цитологии РАН (Санкт-Петербург) не подвергает сомнению сам метод лечения стволовыми клетками, но пока не понятно, как происходит взаимодействие стволовых клеток с поражёнными тканями. Считает, что от понимания этого зависит предупреждение побочных эффектов и возможных осложнений, а также их устранение, поэтому требуется проведение масштабных дополнительных исследований (Мнения специалистов, 2007).

5.2. Препятствия для клинического использования эмбриональных стволовых клеток

Проекты с эмбриональными стволовыми клетками человека идут с большими препятствиями. Главное затруднение связано с источниками клеток. Первые 30 линий ЭСК человека получены из резервных бластоцист, оставшихся после операции искусственного оплодотворения. Многие страны наложили вето на лабораторное изготовление бластоцист для получения эмбриональных стволовых клеток. Сохраняется мораторий на все пути лабораторного создания суррогатной яйцеклетки (перенос ядра соматической клетки в энуклеированную яйцеклетку реципиента, слияние соматической клетки с цитоплазмой яйцеклетки, партеногенез).

Лабораторное создание ранних зародышей человека не является этически обоснованной процедурой ещё и потому, что юридический и биоэтический статус индивидуальной жизни между стадиями одной клетки и 250 клеток чётко не прописан. Если лабораторные эмбрионы получат

юридический статус новой жизни, эксперименты с такими структурами станут окончательно невозможными (эквивалентны опытам на людях).

Один из морально допустимых путей решения проблемы – получение эмбриональных стволовых клеток из ранней неорганизованной зародышевой ткани в «обход» морфогенеза раннего зародыша (лабораторной эктодермы или мезодермы).

Другое важное препятствие для клинического использования эмбриональных стволовых клеток – ранняя презентация клетками главных антигенов гистосовместимости. В организме реципиента такие клетки неизбежно уничтожаются его иммунной системой. Локальный позитивный эффект от введения эмбриональных стволовых клеток в организм связан со стимуляцией регенерации, а не с истинной заместительной клеточной терапией.

Долгое время считалось, что во взрослом организме плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) отсутствуют, поскольку их существование ограничено периодом эмбрионального развития. Однако в 70-е годы XX века опубликованы работы, продемонстрировавшие наличие ПСК практически во всех органах взрослых животных и человека (Young H.E., 2002). Теперь принято разделять стволовые клетки на эмбриональные и плюрипотентные. Последние чаще всего выделяют из жировой или мышечной тканей или эпидермиса и дермы кожи. Плюрипотентные стволовые клетки – важный резерв организма. Разработка методов перевода ПСК в культуру без потери их плюрипотентности в ходе клеточных делений, а также способов длительного их хранения создали новую базу для индивидуализированной клеточной терапии.

5.3. Безопасность применения клеточного материала

Широкое использование клеточных технологий в медицинской практике требует разработки стандартной системы обеспечения биологической безопасности применяемых препаратов. Вопросы биологической безопасности культивируемых клеток касаются использования культуральных сред и сывороток, условий культивирования, тестирования клеток на наличие вирусных инфекций и микоплазм, онкогенных свойств, патологических трансформаций клеток, стабильности хромосомного аппарата (Семченко В.В. и др., 2000, 2004)..

Культивирование клеток проводят в специализированных GMP-лабораториях, в соответствии с международными стандартами. В связи с тем, что в культуральную среду добавляют фетальную сыворотку коров, были высказаны опасения о возможности заражения пациентов бычьей губчатой энцефалопатией. По этой причине в настоящее время используют сыворотку, поставляемую из стран, в которых не наблюдались случаи данного заболевания. Но самое верное решение при культивировании клеток в рассматриваемой ситуации - использовать бессывороточные среды.

В связи с тем, что клеточные технологии в Российской Федерации получили развитие только в последние несколько лет, в настоящее время вопросы стандартизации обследования клеточных культур находятся в разработке. В условиях отсутствия специализированной законодательной базы, при тестировании клеточных культур следует учитывать следующие документы:

Законы РФ:

– «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации, 323-ФЗ от 22.11.2011»

– «О трансплантации органов и тканей человека»,

– «Временной инструкции о порядке исследования в области клеточных технологий и их использования в учреждениях здравоохранения» от 18.04.2002,

– Приказ № 325 МЗ РФ «О развитии клеточных технологий в Российской Федерации» от 25.07.2003, а также

– Методические Указания 4.1/4.2.588.96 «Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям» от 31.10.1996.

В соответствии с вышеперечисленными документами, кровь донора клеток и полученные культуры фибробластов должны быть обследованы методами твердофазного иммуноферментного и полимеразноцепной реакции на наличие инфекционных агентов: провирусной ДНК и вирусной РНК ВИЧ-1 и ВИЧ-2; РНК вируса гепатита С; ДНК вируса гепатита В; ДНК вирусов простого герпеса 1 и 2-го типов; ДНК вируса Эпштейна – Барр; ДНК папилломавирусов 6-го и 11-го типов; ДНК микоплазмы; ДНК токсоплазмы.

Доклинические исследования на бестимусных мышцах показали, что культивированные фибробласты не проявляют онкогенных свойств. Также не обнаружено окислительных повреждений ДНК. В культуре клеток не наблюдали трансформации фибробластов в патологические, вызывающие фиброз тканей. Отсутствовало образование келоидных и гипертрофических рубцов вследствие внутрикожных инъекций аутодермальных фибробластов. Использование аутодермальных фибробластов для коррекции морщин и рубцов постакне (компания ISOLAGEN.CLUA) продемонстрировало безопасность и клиническую эффективность данной процедуры (завершена III фаза клинических исследований FDA, пролечено 1250 пациентов – 4800 инъекций), наблюдения проводили в течение 7 лет.

Доказано, что при длительном культивировании фибробласты теряют способность синтезировать белки внеклеточного матрикса, возникает риск накопления в клетках хромосомных аномалий. В этой связи, наиболее безопасными для клинического применения являются фибробласты, находящиеся на более ранних пассажах (обычно на 4-6-ом).

Фоновый уровень хромосомных aberrаций для различных тканей человека составляет около 3%. В этой связи, для предотвращения отдаленных последствий применения клеточных препаратов необходимо

проводить анализ стабильности хромосомного аппарата используемых клеток, поскольку уже на ранних пассажах возможно появление субклонов с хромосомными аномалиями. Цитогенетический анализ может включать комплексное исследование культуры по определению доли клеток: с двойными ядрами и микроядрами, в состоянии апоптоза, с преждевременной конденсацией хромосом по отношению к количеству делящихся клеток.

Также можно проводить рутинный анализ хромосомных аберраций, при котором учитывается количество одиночных и парных фрагментов, кольцевых и дицентрических хромосом, обменов хромосомного и хроматидного типов. В исследование включают не менее 200 метафаз.

Необходимо также проводить кариотипический анализ хромосом (не менее 20 метафаз для культуры) с помощью дифференциального окрашивания или методами SKY, mFISH. Для определения уровня анеуплоидии, тетраплоидии и точечных разрывов хромосом удобно использовать FISH-метод с соответствующими ДНК-зондами.

5.3.1. Генетическая безопасность клеточной терапии

Одним из главных условий применения клеточной терапии в практической медицине является обеспечение безопасности ее проведения. Вопросам генетической безопасности клеточных трансплантатов до последнего времени уделялось недостаточно внимания. Культивирование клеток может приводить к возникновению клеток с абберантным кариотипом и их позитивной селекции в популяции, что может явиться причиной «загрязнения» клеточного трансплантата. Генетически абберантные клетки в организме реципиента рано или поздно могут стать «бомбой замедленного действия» в отношении злокачественного роста или нарушений иммунитета. Одним из методов оценки генетической безопасности является цитогенетическое исследование. Оно позволяет определить генетическую стабильность клеточных линий и выявлять линии, несущие хромосомные перестройки.

Цитогенетические параметры безопасности стволовых клеток изучались по двум позициям: кариотипирование и оценка уровня геномных мутаций, анеуплоидии и полиплоидии на культурах мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, полученных из костного мозга и жировой ткани взрослых индивидов на ранних (3-4) и поздних (10-14) пассажах (Воронина Е.С. и др., 2007).

На 4-14-ом пассажах в отдельных культурах выявлены клоны с измененными кариотипами (моносомия по 6-ой хромосоме, Робертсоновская транслокация 21/22, трисомия по двум хромосомам группы C). В одной культуре из костного мозга выявлен мозаицизм: часть клеток имела нормальный мужской кариотип (46,XY), другая часть – 45,X.

На ранних пассажах частота клеток с моносомией и трисомией по отдельным изученным хромосомам соответствовало таковой для культур

лимфоцитов. Однако обнаружена повышенная частота полиплоидных клеток в культурах - 0,8-3,0%. Спонтанный уровень хромосомных aberrаций в культурах ММСК из жировой ткани укладывался в верхние границы уровня спонтанных хромосомных aberrаций для культур лимфоцитов человека. Основную долю aberrаций составили одиночные фрагменты. В культурах поздних пассажей (10-14) обнаружена повышенная частота анеу- и полиплоидных клеток.

В 50% культур мультипотентных мезенхимных стромальных клеток поздних пассажей обнаружена хромосомная изменчивость, которая выражалась в виде нестабильных хромосомных aberrаций, транслокаций хромосом и анеуплоидий. Значимость таких изменений пока не ясна, но вряд ли они безразличны для судьбы клеток, которые после культивирования будут трансплантированы в организм. При этом надо иметь в виду, что примененные в данной работе методы позволяют учитывать только крупные хромосомные аномалии и анеуплоидии, а использование молекулярно-цитогенетических методов может выявить хромосомные аномалии еще в большем масштабе.

Следовательно, необходим цитогенетический контроль стволовых/прогениторных клеток перед их трансплантацией, как часть системы обеспечения безопасности клеточной терапии. Клеточная терапия тем безопаснее, чем меньше делений пройдет в культуре стволовых клеток (Воронина Е.С. и др., 2007).

5.3.2. Сравнительный цитогенетический анализ мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток ранних пассажей и лимфоцитов человека

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки человека обладают способностью к ограниченному самообновлению и дифференцировке в нескольких направлениях. Возможность ММСК дифференцироваться в клетки мезенхимного происхождения, такие как адипоциты, хондроциты и остециты, является чрезвычайно привлекательной для развития биомедицинских технологий (Abdallah V.M. et al., 2009). Свойства мультипотентных мезенхимных стромальных клеток позволяют использовать их для восстановления структуры и функций поврежденных тканей, в особенности в тех ситуациях, когда традиционные методы лечения малоэффективны. Применение ММСК открывает широкие возможности для лечения и профилактики таких тяжелых заболеваний, как сахарный диабет, печеночная недостаточность (Gohari S. et al., 2002), инфаркт миокарда и кардиомиопатии (Smits P.O. et al., 2003; Hill J.M. et al., 2004; Kang H.J. et al., 2004). При этом, что трансплантация аутогенных стволовых клеток костного мозга не приводит к иммунному конфликту и не противоречит биоэтическим нормам.

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, являясь резидентами стромы костного мозга, присутствуют в ней в небольшом количестве (1 на 10^4 - 10^5 клеток) (Jorgensen C. et al., 2003). Недостаточное для терапевтических целей число ММСК, получаемых непосредственно из красного костного мозга, требует их наращивания в культуре. Согласно данным ряда исследований, при увеличении объема клеточной массы методом пассирования в культуре, появляются клетки с возникшими *de novo* нарушениями хромосомного набора, дающие впоследствии аномальные клеточные линии (Rubio D. et al., 2005; Wang Y. et al., 2005; Bochkov N.P. et al., 2007; Tolar J. et al., 2007). Среди аномалий кариотипа ММСК одни авторы обнаруживают анеуплоидию – отличное от нормального (46,XX или 46,XY) число хромосом (Bochkov N.P. et al., 2007), другие – выявляют структурные aberrации хромосом (Rubio D. et al., 2005; Wang Y. et al., 2005). Также исследователи отмечают сочетанные аномалии, при которых идентифицируют как анеуплоидный хромосомный набор, так и структурно перестроенные хромосомы (Bochkov N.P. et al., 2007; Tolar J. et al., 2007).

Изменение количества генетического материала может привести к аномальному функционированию генома, что оказывает крайне негативное влияние на клетку, вплоть до опухолевой трансформации (Burns J.S. et al., 2008). В связи с этим, применение в терапии клеточных линий с аномальным кариотипом недопустимо. Однако изменение кариотипа мультипотентных мезенхимных стромальных клеток при пассировании подтверждено не всеми авторами. Таким образом, вопрос об изменениях кариотипа ММСК в культуре остается открытым.

Выделяют несколько факторов, приводящих к изменениям кариотипа ММСК *in vitro*. Возможными причинами возникновения аномалий хромосомного набора мультипотентных мезенхимных стромальных клеток являются собственно биологические свойства стволовых клеток, особенности условий культивирования, индивидуальные свойства генома донора клеток, предрасполагающие к появлению хромосомных aberrаций. Эти факторы необходимо учитывать при цитогенетическом анализе ММСК, так же как наличие сбалансированных перестроек хромосом в конституциональном кариотипе донора ММСК. В связи с этим целью проведен цитогенетический анализ культур мультипотентных мезенхимных стромальных клеток ранних пассажей и лимфоцитов доноров-добровольцев (Stacey G.N. et al., 2008).

Добровольными донорами мультипотентных мезенхимных стромальных клеток и лимфоцитов явились трое мужчин и три женщины в возрасте от 28 до 46 лет. Перед получением биологического материала проводили анкетирование доноров-добровольцев.

Мультипотентные мезенхимные стромальные клеток эксплантировали из стерильного пунктата костного мозга объёмом 2-8 мл. Полученный пунктат разбавляли в два раза питательной средой, фракционировали в градиенте Ficoll, отбирали слой мононуклеарных клеток, клетки промывали

питательной средой, центрифугировали, осадок суспензировали в культуральной среде и высевали во флакон для культивирования. Для пересева культуры использовали раствор трипсина и ЭДТА. Первый пересев культуры ММСК проводили через 6-10 сут после эксплантации, далее культуру пересевали каждые 5-7 суток. Замену питательной среды производили каждые трое суток. После третьего пассажа культуру криоконсервировали по стандартной методике (Stacey G.N. et al., 2008) и хранили от 1 месяца до 1 года, затем размораживали и культивировали до 7-го пассажа.

Перед замораживанием и после процесса размораживания проводили иммунофенотипирование культуры ММСК методом проточной цитофлуориметрии с окрашиванием антителами к специфическим поверхностным маркерам. Для фенотипирования ММСК использовали антитела к CD34 и CD45, CD90, CD44, CD105 и CD106. Клетки анализировали на проточном цитофлуориметре Epics XL.

После каждого пассажа, начиная с четвертого и заканчивая седьмым, для части культуры мультипотентных мезенхимных стромальных клеток каждого донора проводили хромосомный анализ, а оставшиеся клетки пересевали в другой флакон, для того чтобы провести аналогичный анализ после следующего пассажа.

Для получения препаратов метафазных хромосом с целью дальнейшего кариотипирования добавляли раствор колхицина и инкубировали в течение 4-6 часов. Для получения суспензии клеток культуру мультипотентных мезенхимных стромальных клеток обрабатывали раствором трипсина с раствором Версена. Суспензию клеток переносили в центрифужные пробирки, после гипотонической обработки и префиксации центрифугировали, осадок разбивали пипетированием и фиксировали смесью этанола и ледяной уксусной кислоты, центрифугировали, суспензию раскапывали на охлажденные предметные стекла, высушивали.

Получение препаратов метафазных хромосом из мультипотентных мезенхимных стромальных клеток и лимфоцитов периферической крови доноров проводили в соответствии со стандартным протоколом. Производили подсчет числа хромосом и анализ их структуры на 8-15 метафазных пластинках из ММСК после каждого пассажа, начиная с четвертого и заканчивая седьмым, и 11-15 метафазных пластинках из лимфоцитов периферической крови каждого донора.

В результате кариотипирования ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови всех доноров ни у одного из них не были обнаружены метафазные пластинки с отличным от нормального числом хромосом, а также не установлено структурных изменений хромосом.

Фенотип популяции ММСК, использованной для кариотипирования, не изменился после размораживания и последующего культивирования и был определен как CD34⁽⁻⁾, CD45⁽⁻⁾, CD44⁽⁺⁾, CD90⁽⁺⁾, CD105⁽⁺⁾ и CD106⁽⁺⁾. В результате цитогенетического анализа культур мультипотентных

мезенхимных стромальных клеток, проведенного после каждого пассажа, начиная с четвертого и заканчивая седьмым, не выявлено изменений числа и структуры хромосом во всех исследованных метафазных пластинках. Во всех случаях установлен нормальный кариотип, соответствующий кариотипу лимфоцитов периферической крови тех же индивидов.

Таким образом, в пассированных культурах мультипотентных мезенхимных стромальных клеток доноров с нормальным конституциональным кариотипом, установленным при цитогенетическом анализе ФГА-стимулированных лимфоцитов, не зарегистрированы клетки с измененным числом и/или структурой хромосом.

В настоящей работе установлен нормальный кариотип клеточных культур ММСК, полученных от здоровых доноров-добровольцев. В рамках выполненного цитогенетического анализа на ранних пассажах (с четвертого по седьмой) не зарегистрированы клетки с абберрантными кариотипами, что позволяет предположить отсутствие в исследованных культурах мультипотентных мезенхимных стромальных клеток аномальных клонов. В результате кариотипирования культур ММСК ни у одного из доноров не было выявлено полиморфных вариантов хромосом, что полностью соответствует кариотипу, установленному для ФГА-стимулированных лимфоцитов каждого донора. Проведенное исследование позволяет говорить об отсутствии межтканевых различий кариотипа между мультипотентными мезенхимными стромальными клетками ранних пассажей и лимфоцитами человека.

Результаты выполненного авторами исследования согласуются с данными ряда работ. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, донорами которых были пациенты с нарушениями функций головного мозга, характеризовались нормальным кариотипом в первичной культуре и сохраняли его на ранних пассажах – с первого по третий (Zhang Z.X. et al., 2007). На пассажах со второго по одиннадцатый в культурах ММСК, полученных от здоровых доноров, установлен нормальный кариотип (Bernardo M.E. et al., 2007). Среди модельных объектов нормальный кариотип имеют стволовые клетки, выделенные из мышечной ткани крыс (Henson N.L. et al., 2005), а также ММСК свиней как в первичной культуре, так и при длительном пассировании (Nakamura Y. et al., 2007).

В то же время результаты других исследований демонстрируют появление хромосомных aberrаций в культурах как региональных, так и эмбриональных стволовых клеток (Buzzard J.J. et al., 2004; Inzunza J. et al., 2004; Rosier E.S. et al., 2004; Maitra A. et al., 2005; Rubio D. et al., 2005; Wang Y. et al., 2005; Vochkov N.P. et al., 2007). Противоречивость литературных данных может быть обусловлена несколькими причинами. Одной из них являются собственно биологические свойства стволовых клеток. Так, эмбриональные и региональные стволовые клетки различаются по ряду характеристик, в основном касающихся выраженности степени специализации, способности к дифференцировке, пролиферации,

ассиметричному делению и регенерации. При этом ЭСК, обладая более выраженным потенциалом к пролиферации при культивировании в большей степени подвержены изменениям кариотипа, чем региональные стволовые клетки, в том числе и мезенхимные.

Другой причиной противоречивости накопленных данных может быть применение авторами разных методик культивирования и пассирования стволовых клеток. Так, в работах, где показано наличие хромосомных aberrаций в культурах стволовых клеток, в основном применяли методы энзиматического пассирования, а авторы, не обнаружившие аномалий кариотипа, использовали механическое пассирование, при котором селекция клеток основывается на их морфологических характеристиках (Buzzard J.J. et al., 2004; Cowan C.A. et al., 2004; Inzunza J. et al., 2004; Mitalipova M.M. et al., 2005). По-видимому, на возникновение хромосомных перестроек и/или появление дополнительных хромосом в кариотипе стволовых клеток, по крайней мере, отчасти, могут влиять реагенты, применяемые одними исследователями и не используемые другими. Не исключено, что для сохранения стабильности кариотипа стволовых клеток требуется подбор особых условий культивирования и пассирования.

На возникновение аномалий кариотипа культуры стволовых клеток могут также влиять индивидуальные особенности донора клеток. Так, известно, что употребление донорами ряда сильнодействующих лекарственных средств, в число которых входят цитостатические препараты, используемые при лечении онкологических заболеваний, в значительной мере повышает вероятность появления клеток с aberrантными кариотипами (Bajic V., 2007). Сходный эффект может наблюдаться, если на момент получения биологического материала или незадолго до него донор перенес острое инфекционное заболевание (Urazova O.I., 2001; Giannelli F. et al., 2003).

Вышесказанное позволяет предположить, что результаты работ, демонстрирующих аномальный кариотип в культурах мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, вероятно, могут объясняться условиями культивирования или индивидуальными особенностями доноров клеток. Разработанная авторами схема эксперимента позволила учесть возраст и пол доноров ММСК, особенности их конституционального кариотипа, а также возможное влияние на результаты кариотипирования мультипотентных мезенхимных стромальных клеток внешних факторов и состояния здоровья доноров.

Несмотря на различные данные, касающиеся состояния здоровья доноров и применения ими лекарственных препаратов, цитогенетическое исследование лимфоцитов и ММСК во всех случаях позволило установить нормальный кариотип. Кроме того, полученные авторами результаты являются подтверждением принципиальной возможности подбора условий пассирования, в которых хромосомный набор мультипотентных

мезенхимных стромальных клеток остается нормальным в течение шести пассажей.

Таким образом, результаты настоящего исследования подтверждают, что в использованных авторами условиях культивирования и пассирования мультипотентные мезенхимные стромальные клетки человека сохраняют нормальный конституциональный кариотип на ранних пассажах. Однако эти данные не позволяют предсказать возможности появления клонов клеток с числовыми и/или структурными aberrациями хромосом при более длительном пассировании культур в связи с тем, что это требует увеличения числа проанализированных пассажей и метафазных пластинок.

Возникновение аномалий кариотипа в культурах мультипотентных мезенхимных стромальных клеток является серьезным препятствием для их применения в медицине из-за высокого риска появления нежелательных побочных эффектов. Поэтому для клеточных технологий допустимо использовать стволовые клетки только ранних пассажей. Для обеспечения безопасности применения мультипотентных мезенхимных стромальных клеток целесообразным кариотипировать их культуры непосредственно перед использованием в терапии для оценки стабильности хромосомного набора клеток (Шалыгина Ю.А. и др., 2009).

5.4. Паспортизация и обеспечение безопасности при работе с клеточными материалами

Современный уровень развития медицинских клеточных технологий требует обязательной паспортизации клеточных материалов, являющейся необходимым элементом обеспечения их стандартности и безопасности.

В настоящее время в Российской Федерации отсутствуют единые подходы и стандарты тестирования культур клеток, полученных *de novo*. Вместе с тем, тестирование на наличие инфекционных агентов является процедурой, необходимой для обеспечения инфекционной безопасности при работе с клеточными материалами, и требует разработки соответствующей нормативной базы.

В отсутствие специализированного законодательного обеспечения тестирование культур клеток должно учитывать законы РФ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации», «О трансплантации органов и тканей человека», «Временную инструкцию о порядке исследований в области клеточных технологий и их использования в учреждениях здравоохранения» от 18.04.2002, Приказ № 325 МЗ РФ «О развитии клеточных технологий в Российской Федерации» от 25.07.2003, а также МУК 4.1/4.2.588.96 «Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям» от 31.10.1996, о чем говорилось выше.

В соответствии с вышеперечисленными документами был составлен список инфекционных агентов, подлежащих обязательному тестированию в

донорской крови (при первичном обследовании) и полученных *de novo* культурах клеток (перед выдачей клеточного материала).

Согласно утверждённому перечню МЗ РФ и стандартным методикам, обследование крови донора с целью выявления инфекционных агентов проводится с помощью твердофазного ИФА и ПЦР.

Культуры фибробластов кожи человека, мезенхимальных клеток из костного мозга человека, мезенхимальных клеток из пуповины и плаценты человека, полученных после нормальных родов на 38-40-ой неделе гестации, подвергают анализу методами ПЦР на присутствие провирусной ДНК и вирусной РНК ВИЧ-1 и ВИЧ-2; РНК вируса гепатита С; ДНК вируса гепатита В; ДНК вирусов простого герпеса 1-2-го типов; ДНК цитомегаловируса; ДНК вируса Эпштейн-Барр; ДНК микоплазмы; ДНК токсоплазмы.

Наиболее адекватным является дифференцированный подход, в рамках которого контролируемые параметры инфекционной безопасности зависят от происхождения клеточной культуры. Например, культуры клеток пуповины и плаценты человека нуждаются в дополнительном тестировании на возбудителей урогенитальных инфекций (уреаплазмы, хламидии). Культура клеток фибробластов кожи такого исследования не требует, однако ее необходимо обследовать на наличие папилломавирусов 6-го и 11-го типов.

Разработка подходов к паспортизации клеточных материалов является предпосылкой для разработки нормативной базы, регламентирующей безопасное использование культур клеток в доклинических и клинических испытаниях (Бурунова В.В. и др., 2007).

5.5. Молекулярная медицина и биобезопасность

В последние годы для врачей и биологов актуальной темой стал «биотерроризм», который определяется как «бесконтрольное применение стволовых клеток сомнительного происхождения».

На второй конференции на тему «Молекулярная медицина и биобезопасность» (2005), тематика которой касалась таких тем, как биотерроризм, GM-продукты, генная инженерия, клеточная терапия и онкология, академик М.А. Пальцев отметил, что бесконтрольное применение клеточных технологий является угрозой биологической безопасности страны. Он потребовал прекратить чрезмерный ажиотаж вокруг стволовых клеток, так как бум, связанный с применением в российских клиниках стволовых клеток сомнительного происхождения, становится международной проблемой и вызывает беспокойство во многих зарубежных странах и увеличивает поток иностранцев, желающих лечиться при помощи клеточных технологий в России (Исаев А.И., 2005).

В 2009 году в журнале PLoS Medicine появилась сенсационная статья о последствиях бесконтрольного применения клеточной терапии в России (Amariglio N., et al., 2009). В публикации шла речь о диагностике в клинике Тель-Авива мультифокальной глионейрональной неоплазии в головном

мозге 13-летнего пациента с атаксией-телеангиэктазией, носителя гомозиготной мутации в гене *ATM*. В возрасте 10 и 12 лет в одной из Московской клиник (название клиники в статье не упоминается) ему были проведены две процедуры внутримозговой и подболобочечной инъекции «человеческих фетальных нейрональных стволовых клеток», полученных от спонтанно абортированных плодов. Молекулярно-генетический анализ с помощью полиморфных микросателлитных повторов ДНК и флуоресцентной *in situ* гибридизации с ДНК-зондами на половые хромосомы показал, что опухолевые клетки не принадлежали пациенту, а происходили как минимум от двух генетически различных доноров.

Критический анализ данного случая, с одной стороны, показывает, что нейрональные стволовые или прогениторные клетки (при условии, что именно они были введены пациенту) могут быть вовлечены в глиомогенез. А раз так, то это первый зарегистрированный случай достаточно быстрого формирования опухоли мозга при использовании клеточной терапии. С другой стороны, возникает ряд закономерных вопросов о правомерности использования такой терапии (как с правовой и юридической точек зрения, так и в медицинском и научном аспекте). Опубликованный через два дня после выхода статьи комментарий в *Nature* начинался с громкой фразы: «Russian treatment linked to cancerous growths» («Русское лечение связано с опухолевым ростом») (Baker, 2009).

5.6. Проблемы контроля качества продукции клеточных технологий

Отсутствие четкого законодательства, регулирующего деятельность в области клеточных технологий, тормозит их развитие. Организационные проблемы существуют на всех этапах от создания клеточной технологии до применения продукции клеточных технологий в клинических испытаниях. Для лаборатории, создающей продукцию клеточных технологий, основной проблемой является контроль качества выпускаемой продукции, так как качество продукции прямо связано с обеспечением безопасности субъекта клинических испытаний.

В связи с отсутствием нормативно-правовых актов, регулирующих контроль качества продукции клеточных технологий, отсутствует стандарт для так называемого клеточного паспорта или сертификата продукции клеточных технологий, в котором должны быть отражены все необходимые параметры продукта. Контроль качества продукции, выпускаемой лабораториями клеточных технологий, в настоящее время заключается, как правило, в контроле донора по основным, наиболее часто встречающимся инфекциям, передающимся с кровью, в бактериальном контроле исходного материала, поступающего в лабораторию и фенотипировании конечного

продукта. В некоторых лабораториях продукция также подвергается микроскопическому анализу перед передачей учреждению, проводящему соответствующие клинические исследования. При этом недавно открытые нанобактерии, которые оказывают существенное влияние на функционирование клетки, сегодня чаще всего не определяются даже при трансплантации аллогенных клеток (Жукоцкий А.В. и др., 2010).

Чувствительным методом оценки генетической стабильности культур стволовых клеток является сочетание кариотипирования и оценки анеуплоидии с помощью интерфазной флюоресцентной гибридизации *in situ*. Опубликовано методическое пособие по тестированию клеточных трансплантатов на генетическую безопасность (Бочков Н.П. и др., 2009), в котором на примере мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека описаны методические приемы, особенности приготовления и анализа цитогенетических препаратов.

5.7. Менеджмент качества медицинской помощи и обоснованность риска при использовании клеточных технологий в системе обязательного медицинского страхования

Медицинская общественность информирована о правилах менеджмента качества медицинской помощи и обоснованности риска при использовании клеточных технологий в системе обязательного медицинского страхования (Старченко А.А. и др., 2010).

5.8. Нерешенные вопросы и перспективы безопасности клеточных технологий

Клеточные технологии находят все большее применение в медицинской практике. Использование культивированных *in vitro* клеток, например, при длительно незаживающих ранах показало результаты, недостижимые посредством других, известных на данный момент, способов, а в случае тяжелых лучевых поражений это, практически, единственный клинически эффективный метод.

Развитие клеточных технологий за последние несколько лет и внедрение их в широкую медицинскую практику требует создания четкой законодательной базы (1). Особого внимания требуют вопросы биологической безопасности (2) используемых материалов и культивированных клеток. Среди важных аспектов в данной области заслуживает внимания, в первую очередь, переход при культивировании клеток на бессывороточные среды (3); уточнение перечня инфекционных агентов (4), которые необходимо определять в клеточных культурах; введение обязательного цитогенетического исследования культивированных клеток (5) на планируемом для клинического применения пассаже.

Важным шагом при создании трансплантатов является переход на аутогенные клетки (6). В связи с тем, что наработка достаточного количества фибробластов требует значительных затрат времени (3-6 недель), возникает необходимость создания банков аутоклеток (7). Такие банки представляют собой своеобразную систему «биологического страхования» населения и являются наиболее актуальными для людей, занятых на производстве, связанном с вредными воздействиями на организм (механическими, термическими, радиационными, токсическими), а также для пациентов перед химиотерапией. Кроме этого, банкированные в молодом возрасте клетки могут быть использованы в дальнейшем для эффективной коррекции возрастных изменений кожи.

Актуальным направлением в области клеточных технологий по восстановлению кожного покрова является создание эквивалентов дермы (8), содержащих не только фибробласты и кератиноциты, но и другие клеточные элементы (например, эндотелиоциты), а также цитокины, факторы роста и вещества для антимикробной защиты. Разработка методов комплексного лечения различных патологических состояний с использованием сочетания коммерческих кожных эквивалентов и культивированных аутофибробластов позволит значительно уменьшить потребность в аутотрансплантации кожи.

Перспективным направлением в области клеточных технологий является также развитие методов лечения генетических заболеваний (9). Применение фибробластов в капсулах (10) позволит уменьшить симптомы аутоиммунных заболеваний кожи. Коррекция генетических дефектов культивированных клеток (11) позволит эффективно лечить генодерматозы. Данная патология требует разработки принципиально нового способа введения генетического материала в клетку, поскольку имеющиеся в настоящее время технологии с использованием ретровирусов характеризуются низкой эффективностью и связаны с повышенным риском онкотрансформации. Метод, основанный на применении плазмид, – быстро элиминирует плазмиды из клеток и является перспективным в плане дальнейшей его разработки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несомненно, современное состояние проблемы репарации поврежденных тканей свидетельствует о том, что клеточные технологии относятся к категории биотехнологий, которые наряду с нанотехнологиями являются приоритетными направлениями развития науки.

Развитие и применение клеточных технологий может существенно улучшить качество медицинской помощи животным и населению, привести к росту качества жизни, увеличению трудоспособного возраста, продлению жизни пациентам, в том числе, с неизлечимыми заболеваниями.

Бурное развитие наук о клетке привело к тому, что на рубеже XX и XXI веков появились технологии, позволяющие использовать клетки на любой стадии дифференцировки, взятые из любых тканей и органов животных и человека, с целью получения специального клеточного продукта, обладающего высокими потенциальными возможностями репарации поврежденного органа. Это своеобразные высокотехнологичные лекарственные формы нового поколения, используемые для восстановления структур и функций тканей, органов путем замещения клеток этих тканей и органов клетками, вводимыми извне или путем активации собственных восстановительных процессов организма человека и животных. Фактически, речь идет о создании новой отрасли биомедицины или биофармацевтики на основе молекулярной и клеточной биотехнологий, позволяющих целенаправленно изменять генетический материал клетки и регулировать процесс ее дифференцировки.

Очевидно, что в ближайшем будущем биомедицинские технологии выйдут на передний план мировых исследований и во многом определят облик будущей науки и индустрии. Прежде всего, основными точками роста, которые повлияют на будущее новой индустрии, являются системы массового генотипирования, продукты персональной медицины, клеточные и регенеративные технологии, которые могут задать новые стандарты качества жизни и уже получили активное развитие по всему миру.

В практическую медицину клеточные технологии стали активно внедряться в 60-х годах прошлого века – это и переливание крови, и пересадка костного мозга, и экстракорпоральное оплодотворение. Настоящая биотехнологическая революция связывается с получением инсулина на основе технологии рекомбинантных ДНК в 70-80-х годах. Сегодня уже ведутся активные исследования в области использования индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Это совершенно новый подход, позволяющий разработать технологии, исключающие использование нативных эмбриональных стволовых клеток.

В настоящее время в области геномных и клеточных технологий можно выделить следующие приоритетные задачи:

1. Ассоциирование генома человека и животных с предрасположенностями к заболеваниям, индивидуальной восприимчивостью к веществам и лекарствам, а также поведением и характеристиками личности.

2. Процессы выращивания в режиме реального времени органов и тканей животных и человека из собственных клеток, исключаящие потребность в донорских органах.

3. Технологии масштабного управления геномом, открывающие доступ к изменению наследственности, что может привести к радикальному изменению представления о жизни человека.

4. Создание промышленных технологий получения синтетических форм жизни.

5. Переход к формированию технологической базы для создания нового мира и целенаправленной модификации природы (генома) организма животных и человека.

Таким образом, молекулярная и клеточная биотехнологии очень тесно связаны между собой, как молекулярная биология и цитология. В любом случае целенаправленная модификация генома клеток базируется на методах молекулярной биотехнологии.

Особое внимание уделяется изучению механизмов регуляции функционального состояния и дифференцировки стволовых и прогениторных клеток. Стволовая клетка в процессе деления образует специализированные клетки различных тканей. Выделяют несколько источников таких клеток: 1) эмбриональные стволовые клетки (источник – бластоциста-зародыш, сформированный к пятому дню оплодотворения), 2) фетальные – получают из абортивного материала на 9-12-й неделе беременности, 3) клетки пуповинной крови (источник – плацентарно-пуповинная кровь), 4) гематопозитические и мезенхимальные стволовые клетки костного мозга взрослого организма. В процессе онтогенетического развития количество стволовых клеток в тканях уменьшается, снижая их репаративный потенциал.

Получены важные результаты исследований в области технологий, которые используют стволовые клетки. Так, ученые из университета Джона Хопкинса установили, что для определения пути развития стволовых клеток, которые располагаются в костном мозге, решающую роль играют не молекулярные сигналы, а форма, которую клеткам приходится приобретать, и размер их личного пространства.

Исследователям из Онкологического центра доктора Андерсона при Техасском университете удалось воздействовать на стволовые клетки – предшественники мышечных и трансформировать их, вопреки своему предназначению, в нейроноподобные клетки.

Новый способ выращивания стволовых клеток вне тела человека открыла американская компания Cytomatrix. Ее специалисты выяснили, что клетки бурно развиваются в трехмерной углеродно-металлической матрице

(углеродная основа и металлическое напыление), которая прежде применялась в ракетной промышленности.

Исследователям Сеульского государственного университета во главе с Хван У Соком и Мун Син Ёном благодаря методу клонирования удалось получить стволовые клетки человека и модифицировать их в нейроны.

Доктор Марк Пенн, кардиолог Кливлендской клиники сделал два основополагающих открытия. Первое – то, что сердце пытается себя восстановить после сердечного приступа, вырабатывая молекулу SDF-1 (stromal derived factor, выделяется стромальными клетками многих тканей) в течение нескольких дней после приступа. Второе – то, что выделение молекулы SDF-1 действует как маяк для периферических стволовых клеток, активизируя их для восстановления.

Ученые института исследований стволовых клеток при Эдинбургском университете и японского института Нара обнаружили ген, которому эмбриональные стволовые клетки обязаны своими свойствами. Предположительно он регулирует также и способность стволовых клеток дифференцироваться в различные виды тканей.

Сотрудникам университета штата Висконсин удалось генетически модифицировать человеческие стволовые клетки. По словам доктора Томаса Цваки, это позволит регулировать развитие стволовых клеток, обеспечивая формирование разных типов тканей.

И наконец, японским ученым удалось получить стволовые клетки из фибробластов (соматические дифференцированные клетки). Полученные клетки демонстрируют морфологические особенности стволовых, и в них происходит экспрессия маркеров, характерных для стволовых клеток.

Таким образом, самое важное открытие последних лет, изменившее возможности регенеративной медицины – преобразование соматических клеток в плюрипотентные (стволовые клетки). Для этого с помощью методов молекулярной биотехнологии в геном клеток встраивают несколько определенных генов, факторов транскрипции, возвращающих клетке способность к дифференцировке по нескольким направлениям. Этот подход значительно расширил возможности аутологичной клеточной терапии и позволил лучше понять механизм многих заболеваний, выделяя пациент-специфичные линии плюрипотентных клеток.

Существует несколько различных стратегий получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, в том числе, без эпигенетической модификации и без внесения в клетку чужеродных генов. Цель разработки все новых подходов к получению индуцированных плюрипотентных стволовых клеток – не только лучшее понимание механизмов дифференцировки клеток и развития заболеваний, но и создание пригодных для клинического применения линий стволовых клеток, не несущих генетических изменений и онкологически безопасных для пациента.

Все это свидетельствует о лавинообразном накоплении знаний в области биотехнологий, необходимости их классификации и внедрения полученных результатов в лечебную практику.

Весь думающий мир разделился на два непримиримых лагеря: сторонников и противников биотехнологической революции. И вполне вероятно, что равновесие в этой системе еще долго существенно не сместится ни в одном из возможных направлений. Необходимо отметить, что против научного развития биотехнологий выступают только крайние ретрограды, а разногласия в основном возникают при решении проблемы получения биоматериала для клеточных технологий.

Мы полагаем, что борьба направлений должна базироваться не на формировании общественного мнения и апелляции к религиозным чувствам и догматам, а на сравнении научных результатов профессионально честных групп исследователей и конкурирующих школ. Получение объективных клинических результатов может быть только при соблюдении принципов доказательной медицины и при проведении мета-анализа на основе клинических исследований разных групп ученых.

Все вышесказанное свидетельствует о неизбежности фундаментальных преобразований в развитии человеческого общества, слияния медицины и ветеринарии с биомедицинской промышленностью. В связи с этим необходимо внесение соответствующих изменений в процесс подготовки будущих специалистов для этой отрасли.

Последовательным сторонником необходимости внедрения молекулярной и клеточной биотехнологии в нашей стране является академик РАМН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биологии Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова В.Н. Ярыгин.

В Российском национальном исследовательском медицинском университете имени Н.И. Пирогова на медико-биологическом факультете открыта кафедра клеточной биологии и технологий (зав. член-корреспондент РАМН, доктор биологических наук профессор Ярыгин Константин Никитич). В этом же учреждении имеется лаборатория медицинских клеточных технологий и отдел биомедицинских технологий.

Полагаем, что необходима адаптация возможностей конкретных вузов для решения подобной комплексной задачи подготовки кадров. В настоящий момент наиболее реальным направлением для большинства гуманитарных вузов является создание профильных кафедр цикла лекций и проведение семинаров по основным направлениям молекулярной и клеточной биотехнологии. Для этого необходимы специализированные монографии и учебники.

По нашему мнению, в курс лекций для студентов целесообразно включать материал по трем основным направлениям: 1) генные технологии (генная инженерия, генная терапия) и клонирование, 2) клеточные технологии (клеточная инженерия, терапия), 3) тканевые и органые

технологии (тканевая и органная инженерия, тканевая и органная терапия). Кроме того, отдельно должны быть представлены данные о правовых, морально-этических и религиозных аспектах всех трех направлений.

В этой связи настоящая монография, содержащая обширный классифицированный фактический материал, будет полезной для специалистов многих направлений клеточных биотехнологий.

ПРИЛОЖЕНИЕ

1. Терминология, используемая в практике генных, клеточных, тканевых и органных технологий

Адиipoцит – клетка жировой ткани.

Аллогенная трансплантация – трансплантация донорских клеток или донорского органа реципиенту того же вида.

Антиген – высокомолекулярное соединение, способное специфически стимулировать иммунокомпетентные лимфоидные клетки и обеспечивать тем самым развитие иммунного ответа.

Антитело – глобулины сыворотки крови животных и человека, образующиеся в ответ на попадание в организм различных антигенов (принадлежащих бактериям, вирусам, белковым токсинам) и специфически взаимодействующие с этими антигенами.

Апоптоз – «запрограммированная» гибель клетки в процессе дифференцировки и преобразования тканей, в частности, в эмбриогенезе.

Асимметричное деление – такое митотическое деление, при котором дочерние клетки не равнозначны по дифференцировочному потенциалу; одна дочерняя клетка сохраняет свой исходный статус, а вторая – под влиянием факторов микроокружения дифференцируется; такой тип деления свойственен стволовым клеткам, обеспечивая их основные свойства – самовозобновление и способность к дифференцировке в различные клеточные типы.

Астроцит – зрелая глиальная клетка звездчатой формы с отростками, играет роль опорной, трофической и защитной структуры в нервной ткани.

Аутологичная трансплантация – трансплантация собственных клеток больному, в частности криосохраненных гемопоэтических стволовых клеток, полученных при рождении данного больного из пуповинной и плацентарной крови.

Банк клеток – учреждение, производящее гарантированное по определенным правилам хранение клеточных образцов, обеспечивающее их последующее применение.

Банкирование – процесс длительного хранения криоконсервированных образцов стволовых клеток.

Биодеградация – процесс разрушения химического соединения под воздействием биологического объекта. То же, что биологическое разрушение химических соединений.

Биосовместимость – интегральная характеристика естественного или искусственного трансплантата, позволяющая ему приживаться в организме реципиента.

Бипотентный – способный развиваться (дифференцироваться) только в двух направлениях.

Бластоцист – ранний эмбрион (с 4- до 7-го дня развития), состоящий из 30-150 клеток. Представляет собой сферу, состоящую из наружного слоя клеток, полости, наполненной жидкостью, и кластера внутренних клеток. Из клеток наружного слоя образуются провизорные органы, создающие условия для развития (трофобласт, хорион, плацента), а из клеток, находящихся внутри бластоцисты, формируется собственно эмбрион. Внутренняя клеточная масса служит основным источником эмбриональных стволовых клеток.

Внутренняя клеточная масса (ВКМ) – у млекопитающих – скопление клеток, расположенное внутри бластоцеля у одного из полюсов. Клетки ВКМ в дальнейшем образуют сам зародыш, а также его провизорные органы – амнион, аллантаис, желточный мешок. ВКМ – основной источник эмбриональных стволовых клеток. Синонимы: эмбриобласт, зародышевый узелок.

Гамета – зрелая половая клетка.

Гастрюла – стадия развития зародыша, трехслойная у позвоночных, возникающая в результате процесса гастрюляции, характеризующаяся обособлением трех зародышевых листков.

Гастрюляция - процесс обособления трех зародышевых листков: экто-, эндо- и мезодермы.

Гемопоз – кроветворение.

Гемопозитическая стволовая клетка (ГСК) – мультипотентная региональная стволовая клетка взрослого организма, в том числе пуповинной и плацентарной крови, способная к дифференцировке во все клетки крови. Синонимы: гематопозитическая стволовая клетка, СКК – стволовая кроветворная клетка.

Ген – функциональная единица наследственности, представляющая собой фрагмент ДНК, локализующийся в хромосоме (или в митохондриальной ДНК).

Геном – полный набор генетического материала, совокупность хромосомных наследственных факторов, передаваемых от родительской особи к дочерней, у человека – набор хромосом.

Гепатоцит – секреторная клетка паренхимы печени.

Геронтология – раздел биологии и медицины, изучающий закономерности старения живых организмов, в том числе человека.

Гомеостаз – относительное динамическое постоянство внутренней среды и устойчивость основных физиологических функций.

ГПКП – гемопозитические клетки пуповинной крови, стволовые гемопозитические клетки, выделяемые из пуповинной крови новорожденных.

Графт – тканеинженерный эквивалент, тканеинженерная конструкция любой ткани или органа; биоматериал (носитель, матрица) + культура клеток.

Графтинг – помещение графта в интересующую зону.

Дедифференцировка (от лат. *dedifferentia* – потеря различий) – утрата клетками специфических свойств с возвращением их морфофункциональной организации к более примитивному состоянию.

Дифференцировка (от лат. *differentia* – различие) – процесс, в ходе которого клетки стойко реализуют закрепленные детерминацией потенции к развитию до дефинитивного морфофункционального состояния; поэтапное созревание неспециализированных клеток в специализированные клетки взрослого организма; необратимое развитие изначально однородных "молодых" клеток в специализированные – зрелые, образующие ткани и органы. Дифференцировка клеток происходит как в развивающихся, так и в зрелых тканях и характеризуется экспрессией части генома. Основа дифференцировки – синтез цито- и тканеспецифичных белков.

Дериват – производное от чего-либо.

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; находится главным образом в ядре клетки, а также в митохондриях (у растений имеется и в хлоропластах); является материальным носителем наследственности; несет информацию по созданию всех структур тела, необходимых для функционирования.

Донор – лицо, предоставляющее часть своей крови, других тканей или орган для переливания или пересадки больному животному или человеку.

Зигота – клетка с диплоидным набором хромосом, возникающая при слиянии двух гамет, например, яйцеклетка, оплодотворенная сперматозоидом.

Иммортализация (бессмертие) – продление времени жизни клетки и увеличения числа её делений без превращения в опухоль, и тем самым продление жизни организма.

Иммортальность – способность клеток к неограниченному размножению, особенность стволовых клеток или клеток в культуре.

Иммунология – медико-биологическая наука, изучающая реакции организма на антиген и разрабатывающая методы защиты.

Иммуносупрессоры – лекарственные средства, угнетающие иммунологические реакции организма.

Иммунофлюоресценция – метод определения количества и/или распределения какого-либо антигена или антитела (иммунного комплекса), при котором антитела маркируются (прямо или косвенно) с помощью флюоресцентного красителя; в случае прямой иммунофлюоресценции (*direct immunofluorescence*) маркировка антитела производится непосредственно перед его воздействием на ткань; при косвенной иммунофлюоресценции (*indirect immunofluorescence*) маркировка антитела производится после его соединения с антигеном с помощью флюоресцентно-маркирующей антииммуноглобулиновой сыворотки.

Имплантация – внедрение тканей и клеток в ткани и органы с лечебной целью.

Импринтинг (геномный импринтинг) – эпигенетический феномен, дифференцирующий материнские и отцовские копии генов в геноме

организма и обуславливающий их моноаллельную экспрессию в зависимости от пола родителя, их передавшего; молекулярную основу геномного импринтинга составляют эпигенетические модификации хроматина (дифференциальное метилирование регуляторных последовательностей импринтированных генов и ковалентные модификации гистонов), устанавливаемые строго специфичным образом в оогенезе и сперматогенезе; потомство получает один набор хромосом с отцовской маркировкой (импринтом, отпечатком) некоторых генов, а другой – с материнской; при образовании у потомка его собственных половых клеток прежний «отпечаток» стирается, и эти гены маркируются в соответствии с полом данной особи; в соматических тканях геномный импринтинг сохраняется, как правило, на протяжении всего онтогенеза; геномный импринтинг в ходе эволюции появляется у плацентарных млекопитающих и строго органичивает их партеногенетическое развитие; явление импринтинга также описано и у цветковых растений.

Индуктор дифференцировки (от лат. *inductio* – наведение, побуждение) – вещество, которое может стимулировать дифференцировку стволовых клеток и клеток-предшественников в определённом направлении.

Индуцированная дифференцировка – дифференцировка клеток, происходящая в результате воздействия на них определённых факторов биологической или химической природы.

Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPS) – плюрипотентные клетки, обладающие свойствами эмбриональных стволовых клеток, получаемые трансфекцией дифференцированных соматических клеток генетическими векторами, несущими совокупность генов транскрипционных факторов, индуцирующих и поддерживающих плюрипотентное состояние.

Инфузия – вливание.

Канцерогенез – процесс возникновения и развития злокачественной опухоли.

Кардиомиоцит – одноядерная мышечная клетка, входящая в состав сердечной мышцы.

Кластер дифференцировки (cluster differentiation, cluster designation, CD) – внесённая в специальную номенклатуру группа моноклональных антител, которые имеют совпадающую специфичность и связывают определённую маркерную молекулу; допустимо применение термина CD по отношению к маркерной молекуле; в настоящий момент насчитывается более 300 CD, внесённых в номенклатуру.

Клетка-предшественник – клетка, находящаяся на низком уровне дифференцировки, но уже коммитированная к развитию в клетки определённой линии.

Клетки «боковой популяции», SP-клетки, Side-population (SP) – популяция клеток, которые обладают способностью выкачивать некоторые

флуоресцентные красители и изначально представляющие собой гемопоэтические клетки.

Клеточная трансплантация – трансплантация (трансфузия) различных типов клеток с целью восстановления повреждённых тканей и органов, либо замещения патологически изменённых собственных клеток реципиента.

Клеточный рост – процесс деления клеток в организме либо в культуре, не сопровождающийся повышением их уровня дифференцировки.

Клон – потомство клеток, возникшее от одного общего предшественника.

Клонирование – искусственное создание копий ДНК, клеток, тканей и организмов, генетически идентичных исходным.

Колониеобразующие единицы (КОЕ) – клетки, способные пролиферировать с образованием колоний в культуре или в органах другого организма.

Коммитирование – специализация стволовых клеток в процессе эмбриогенеза.

Костные морфогенетические белки (Bone morphogenetic proteins, BMPs) – белки, входящие в состав суперсемейства трансформирующих факторов роста; экспрессируясь в областях организаторов зародыша, они, наряду с другими белками суперсемейства, выполняют разнообразные функции: контролируют клеточную репродукцию, программируемую гибель клеток, миграцию клеток, установление осей зародыша, спецификацию мезодермы, дифференциацию нервной системы и органов чувств, морфогенез кишки; у взрослых особей экспрессируются в основном клетками скелетных тканей и являются молекулярными регуляторами остеогенеза.

Крио – приставка, обозначающая какие-либо действия при низких температурах (криоконсервирование, криохранение).

Криоконсервирование – метод длительного сохранения клеток, тканей и органов путём их глубокой заморозки в жидком азоте с применением специальных добавок, сохраняющих жизнеспособность клеток или тканей.

Криопротектор – вещество, служащее для защиты, например, клеток, хранящихся при низких температурах.

Кроветворные (гемопоэтические) стволовые клетки – находящиеся в кроветворных органах и крови, способные давать начало различным росткам кроветворения и дифференцироваться в эритроциты, лейкоциты и тромбоциты.

Лейкемия (лейкоз) – общее название опухолей, возникающих из кроветворных клеток и поражающих костный мозг.

Лейкоцит – форменный элемент крови, имеющий ядро.

Лимфома – общее название опухолей, возникающих из лимфоидной ткани.

Линейные поверхностные антигены (Lineage surface antigen, Lin) – поверхностные антигены, характеризующие определенную клеточную линию.

Линии эмбриональных стволовых клеток человека – впервые изолированы Джеймсом Томсоном в 1998 году из замороженных 4-5-бластоцист человека, оставшихся неиспользованными после искусственного оплодотворения, и одновременно Джоном Герхартом – из половых прогениторных клеток из полового зачатка 4-5-недельного плода; эти линии бессмертны и тотипотентны.

Малигнизация – приобретение клетками нормальной или патологически измененной ткани (например, доброкачественной опухоли) свойств клеток злокачественной опухоли.

Маркер – поверхностная или внутриклеточная молекула, характерная для определенной линии клеток на данном этапе дифференцировки в норме либо при патологии.

Мезенхима – совокупность рыхло расположенных отростчатых, сетевидносвязанных клеток смешанного происхождения, заполняющих в первичной полости тела зародыша промежутки между более плотными зачатками органов и тканей; дает начало клеткам крови, костной, соединительной и гладкой мышечной тканей.

Мезодерма – средний зародышевый листок, образующийся у млекопитающих путем разрастания первичной полоски в виде слоя клеток между экто- и эндодермой.

Мезотерапия – введение в кожу клеточных препаратов.

Метастаз – очаг опухолевого или воспалительного процесса (например, при сепсисе), развившийся в результате переноса патологического материала из другого очага этого процесса в том же организме.

Миграция – процесс перемещения любых клеток, обусловленный сложными избирательными взаимодействиями клеточных рецепторов на мембранах мигрирующих клеток и их микроокружения; *in vivo* данный процесс проявляется перемещением клеток в другие органы.

Миелин – вещество, состоящее из липидов и липопротеидов, принимающее участие в формировании нервной ткани. Его потеря или нарушение структуры приводят с серьезным нарушением функций нервной системы.

Микроокружение: 1) сложная система, включающая клетки и внеклеточный матрикс, обеспечивающая выживание, рост и дифференцировку стволовых клеток посредством специфических биологически активных молекул – сигнальных факторов и межклеточных взаимодействий; 2) клеточный состав и тип межклеточного вещества, характерный для данной ткани.

Миобласт – малодифференцированная клетка, из которой развивается поперечнополосатое мышечное волокно.

Митоз – основная форма клеточного деления, сущность которой заключается в равномерном распределении хромосом между дочерними клетками.

Мозаицизм – наличие в организме, развившемся из одной зиготы, популяций клеток с различным генотипом или кариотипом. Мозаицизм, в отличие от химеризма, формируется вследствие соматических мутаций, происходящих на постзиготических этапах развития. Например, возникновение хромосомного мозаицизма есть результат хромосомного нерасхождения или хромосомного отставания в части соматических клеток эмбриона

Мононуклеарная фракция клеток (от лат. *nucleus* – ядро) – клетки, выделенные из костного мозга или периферической крови посредством отделения от эритроцитов, тромбоцитов и гранулоцитов на градиенте плотности.

Мультипотентная клетка – клетка, способная дифференцироваться в нескольких направлениях в пределах тканевых производных одного зародышевого листка.

Мультипотентность – способность постнатальных стволовых клеток тканей организма дифференцироваться в различные типы клеток соответствующей ткани.

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) – гетерогенная популяция клеток стромы костного мозга и некоторых иных источников, способная к дифференцировке в клетки, имеющие мезенхимальное происхождение: адипоциты, остеоциты, хондроциты, а также в особых условиях *in vitro* – в клетки эктодермального и энтодермального фенотипа.

Мутация – всеобщее свойство живых организмов, лежащее в основе эволюции и селекции всех форм жизни и заключающееся во внезапном изменении генетической информации.

Недифференцированный (недифференцированная клетка) – клетка, не обладающая характеристиками клеток той или иной тканевой принадлежности и способная претерпевать процесс дифференцировки.

Нейральные стволовые клетки (НСК) – региональные стволовые клетки, обладающие потенциалом дифференцировки в нейральные и глиальные элементы.

Нейробласт – малодифференцированная клетка нервной трубки, превращающаяся в дальнейшем в зрелый нейрон.

Нейробластома – злокачественная опухоль, состоящая из незрелых нервных клеток.

Нейроглия – совокупность всех клеточных элементов нервной ткани, кроме нейронов.

Нейрон – высокоспециализированная клетка, являющаяся структурной и функциональной единицей нервной системы.

Нейроэктодерма – утолщение эктодермы зародыша, из которого образуется нервная трубка.

Нервные стволовые клетки – находящиеся в головном мозге, способны дифференцироваться в нейроны, астроциты, олигодендроциты.

Нефропатия диабетическая – нарушение функции почек, связанное с длительным существованием диабета.

Олигодендроцит – клетка нейроглии с малым количеством отростков, окружающая тело нейрона, участвует в обмене веществ нейрона и в процессе образования оболочки нервных волокон.

Опухолевая стволовая клетка (Cancer stem cell) – самоподдерживающаяся клетка, являющаяся источником развития злокачественной клеточной популяции. Считается доказанным наличие таких клеток при лейкозах и некоторых солидных опухолях.

Остеобласт – клетка костной ткани, участвующая в образовании ее межклеточного вещества и превращающаяся в остеоцит.

Остеоцит – зрелая отростчатая клетка костной ткани.

Паренхима – совокупность основных функционирующих элементов внутреннего органа, например, эпителий печени, почек.

Партеногенез – развитие клеток с материнским диплоидным набором хромосом без оплодотворения.

Пассаж – пересев клеточной культуры.

Первичные прогениторные клетки – стволовые клетки половых зачатков.

Печеночные стволовые клетки – способны дифференцироваться в гепатоциты и клетки желчных капилляров.

Перенос ядра соматической клетки – правильное название так называемого «терапевтического клонирования», отражающее процедуру репрограммирования ядра с целью получения линий эмбриональных стволовых клеток с геномом исходной соматической клетки, позволяющую получать иммунологически совместимый клеточный материал.

Персистенция (от англ. *persistence* – постоянство, живучесть, выносливость) – применительно к стволовым клеткам – феномен присутствия и сохранения функционально активных донорских стволовых клеток в организме реципиента.

Пластик-адгезивные клетки – клетки, способные посредством своих рецепторов прикрепляться к культуральному пластику или стеклу.

Пластичность – гипотетическая способность стволовых клеток взрослого организма дифференцироваться в клетки нескольких направлений дифференцировки – производных различных зародышевых листков под воздействием различных стимулов.

Плюрипотентность – способность стволовой клетки дифференцироваться во множество типов клеток в пределах всех трех зародышевых листков..

Плюрипотентный (от лат. *pluro* – много; *potentia* – способность) – клетка, способная дифференцироваться по множеству различных направлений в пределах всех зародышевых листков.

Полипотентность – способность генома постнатальных стволовых клеток изменять профиль плюрипотентности при пересадке в новую ткань

реципиента; относится только к региональным стволовым клеткам взрослого организма.

Популяция – совокупность особей одного биологического вида, способных к свободному скрещиванию и обладающих общим генофондом.

Постимплантационный период – период после имплантации, то есть после внедрения зародыша в слизистую оболочку матки.

Постнатальные стволовые клетки – находящиеся в органах и тканях, способны дифференцироваться в различные типы клеток соответствующих тканей (мультипотентные клетки).

Постнатальный – возникающий или происходящий непосредственно после рождения.

Приживление – явление интеграции трансплантата в организм реципиента, не сопровождающееся реакцией отторжения.

Примитивность – отсутствие у клетки специфических свойств и функций; её потенциальная способность претерпевать процесс дифференцировки с образованием высокоспециализированного потомства.

Пролиферация – (лат. *proliferatio*, от *proles* – потомство и *ferre* – носить, приносить) – процесс клеточного деления, осуществляющегося путем митоза; в гистологии – увеличение числа клеток вследствие их размножения.

Регенеративная медицина – область медицины, занимающаяся вопросами восстановления повреждённых или патологически изменённых тканей и органов посредством трансплантации стволовых клеток, клеток-предшественников и управления их дифференцировкой.

Регионарные стволовые клетки (РСК) – стволовые клетки, имеющиеся в дефинитивных тканях и обладающие дифференцировочными потенциями в пределах данной ткани.

Репрограммирование ядра соматической клетки – изменение генетической программы ядра при его переносе в гетерологическую цитоплазму; репрограммирование ядра клетки может происходить при её трансдифференцировке без переноса ядер.

Репродуктивное клонирование – клонирование с целью создания нового организма, генетически идентичного исходному.

Ретинопатия диабетическая – изменения в сетчатке глаза, вызванные длительным существованием диабета и ведущие к слепоте.

Реципиент – человек или животное, которому проводят переливание крови или ее препаратов или трансплантацию органа или тканей от донора.

Сайленсинг – генетическое подавление клеток.

Самообновление стволовой клетки – способность стволовой клетки поддерживать собственную популяцию в недифференцированном (незрелом, «стволовом») состоянии за счёт микроокружения и влияния специфических ростовых факторов, путем асимметричных делений.

Седиментация – процесс осаждения мелких частиц или макромолекул в жидкости или газе под действием силы тяжести или центробежной силы.

Скаффолд – технология (от англ. *scaffold* – леса, подмости) – культивирование клеток на трёхмерных подложках – носителях естественного или искусственного происхождения с целью пространственного формирования будущего клеточного трансплантата.

Слияние – объединение цитоплазматического и генетического материала гетерологичных клеток (например, донора и реципиента), в результате чего донорские стволовые клетки приобретают характеристики клеток реципиента; синонимы: фьюжн, фузоморфогенез (от англ. *fusion* – слияние и лат. *morphogenesis* – придание формы).

Со(ко)культивирование – совместное культивирование двух или нескольких клеточных линий.

Соматические клетки – все клетки организма, кроме половых (мужских и женских).

Сомит – участок мезодермы, дифференцирующийся в дальнейшем в ткани кожи, мышц и скелета.

Спонтанная дифференцировка – самопроизвольная, происходящая в отсутствие воздействия внешних факторов дифференцировка стволовых клеток.

Стволовые клетки различных тканей органов (регионарные) – находятся в соответствующих тканях и способны дифференцироваться в клетки этих тканей.

Стволовая клетка – любая недифференцированная или малодифференцированная клетка, которая способна при определенных условиях поддерживать собственную популяцию и продуцировать, по крайней мере, один тип коммитированных клеток-предшественников (самообновление и дифференцировка в специализированные клетки), обладающих высоким пролиферативным потенциалом и способностью к дифференцировке в клетки обычно нескольких линий, в организме – в любые клетки данного органа, в эмбрионе – в любую клетку организма.

Стволовые клетки пуповинной и плацентарной крови – стволовые клетки, выделенные из сосудов пупочного канатика и плаценты после рождения ребёнка.

Стволовые клетки взрослых, стволовые клетки дефинитивных тканей; *adult stem cells* – стволовые клетки, находящиеся в тканях взрослого организма.

Стволовые клетки костного мозга – собирательное понятие, под которым понимают как минимум две различные популяции стволовых клеток, находящиеся в костном мозге: стволовые кроветворные клетки (СКК) или гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) и мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) – общие предшественники мезенхимальных производных.

Стромальные клетки – совокупность клеток преимущественно соединительнотканной природы (ММСК, ретикулярных клеток, адипоцитов, фибробластов), формирующих каркас (основу) кроветворных органов;

исключение – тимус, в котором стромальные клетки имеют эпителиальное происхождение; также этим термином могут обозначаться собственно соединительнотканые клетки всех остальных паренхиматозных и трубчатых органов, главным образом формирующие их механический каркас.

Суперовуляция – как правило, индуцированная овуляция большего, чем обычно, числа зрелых яйцеклеток; в медицине используется для получения яйцеклеток с целью искусственного оплодотворения в рамках вспомогательных репродуктивных технологий.

Теломера – терминальный (концевой) участок хромосомы; может наращиваться теломеразой; отсутствие активности теломеразы в соматических клетках на постнатальных этапах онтогенеза приводит к укорочению теломер в каждом цикле клеточного деления, что рассматривается в качестве одного из молекулярных механизмов старения.

Теломераза – фермент, поддерживающий длину теломеры после клеточного деления; активна в эмбриональных стволовых клетках, в пренатальном периоде онтогенеза, а также, в ряде случаев, и в опухолевых клетках.

Теноцит – сухожильная клетка.

Терапевтическое клонирование – один из методов получения эмбриональных стволовых клеток животных и человека – перенос ядра соматической клетки в лишённую собственного ядра яйцеклетку с целью получения индивидуальной линии эмбриональных стволовых клеток.

Тканевая инженерия – междисциплинарная область знаний, включающая в себя биологию, медицину и технические науки, изучающая создание *in vitro* эквивалентов тканей и органов, использующая принцип трансплантации клеточной культуры на биосовместимом носителе.

Тканевая ниша стволовой клетки – отдельная область костного мозга или любой ткани, состоящая из стромальных клеток, обеспечивающая молекулярные сигналы, селективно опосредующие самообновление популяции и дифференцировку стволовых клеток путём взаимодействий клетка–клетка и близкодействующих (паракринных) молекулярных взаимодействий.

Толерантность – способность переносить, устойчивость.

Тотипотентность – неограниченная способность дифференцировки: во все типы клеток, тканей и органов, эмбрион, внезародышевые органы; важнейшее свойство эмбриональных стволовых клеток.

Тотипотентный (от лат. *totalis* – общий, целый и *potentia* – способность) – клетка, способная дифференцироваться не только во все клеточные линии, характерные для данного вида, но и, размножаясь, формировать целостный организм.

Трансдифференцировка (от лат. *trans* – через и *differentia* – различие) – способность стволовой клетки взрослого организма дифференцироваться в клетки другого зародышевого листка; синоним: пластичность.

Трансплантат (от лат. *transplanto* – пересаживать) – совокупность клеток, фрагмент ткани или орган, используемый для пересадки.

Трансплантация – пересадка органов, тканей и клеток в организм с лечебной целью.

Тромбоцит – форменный элемент крови, овальный или круглый, принимающий участие в процессе свертывания крови.

Унипотентный (от лат. *unos* – один и *potentia* – способность) – способный дифференцироваться только в одном направлении (в клетки одной линии), например стволовые сперматогенные клетки.

Фертилизация (оплодотворение) – слияние половых клеток.

Фетальный период – период внутриутробного развития, характеризующийся преобладанием процессов роста и дифференцировки.

Фетальные стволовые клетки (от лат. *fetus* – плод) – стволовые клетки плода, источником которых служит абортивный материал на 9-12-й неделях беременности.

Фетус – плод.

Фибробласт – клетка мезенхимного происхождения, способная синтезировать волокнистые структуры соединительной ткани.

Фидер (от англ. *feed* – кормить) – слой поддерживающих клеток, необходимых для выживания и функционирования в культуре некоторых типов клеток, в том числе стволовых; осуществляет метаболические, сигнальные и иммунопротекторные функции, обеспечивает выживание и самообновление клеток.

Химера иммунологическая – особь, клетки которой содержат антигены своего и чужого генотипов, бывают естественные и искусственные.

Химеризм – наличие в организме популяций клеток с различной генетической конституцией (или разным кариотипом, например 46,XX/46,XY) вследствие объединения разных зигот или морул на ранних этапах развития.

Химеропластика – добавление в культуру клеток небольших по размерам синтетических ДНК/РНК гибридных молекул (*химеропласты*), состоящих из короткой (25 нуклеотидов) цепочки ДНК и комплементарной ей цепочки нуклеотидов РНК.

Хондробласт – малодифференцированная клетка хрящевой ткани, превращающаяся в хондроцит.

Хондроцит – зрелая клетка хрящевой ткани, образующаяся из хондробласта.

Хоуминг (от англ. *homing* – возвращение домой) – способность клеток мигрировать или «возвращаться» в ткани, из которых они были получены, и интеграция клеток в эти ткани посредством специфических рецепторов хоуминга; процесс хоуминга включает в себя три этапа: миграцию клеток по кровеносному руслу, их трансмиграцию в ткани через стенки капилляров, и так называемый *lodging* – удержание клеток в ткани посредством специфических рецепторов.

Эксфузия – изъятие крови из кровеносного сосуда, например, при обменном переливании крови.

Эктодерма – наружный зародышевый листок.

Элиминация – утрата или удаление чего-либо, например, элиминация хромосомы – утрата клеткой хромосомы во время митоза.

Эмбриогенез: 1) в эмбриологии – развитие организма от оплодотворения до рождения; 2) в акушерстве – период внутриутробного развития (первые 8 недель), в течение которого преобладают процессы формирования основ организации и закладки органов.

Эмбрионидные тельца – структуры, формируемые эмбриональными стволовыми клетками в суспензионной культуре и имитирующие предимплантационную стадию развития в условиях *in vitro*; содержат в своем составе производные всех трех зародышевых листков и являются одним из ключевых маркеров эмбриональных стволовых клеток.

Эмбрион – развивающийся человеческий организм от момента оплодотворения до 7–8-й недели развития (с 9-й недели и до рождения называется плодом).

Эмбриональные стволовые клетки – плюрипотентные клетки внутренней клеточной массы бластоцисты (внутри зародышевого пузырька), которые могут превращаться в любой тип клеток всех трех зародышевых листков.

Энграфтмент – условное понятие, характеризующее долю трансплантированных клеток, которые избегают гибели в раннем посттрансплантационном периоде, мигрируют в тканевые ниши и осуществляют свойственные им функции.

Эндодерма – внутренний зародышевый листок.

Эпибласт – наружный зародышевый слой, содержит преимущественно эктодерму и мезодерму.

Эритроцит – безъядерный форменный элемент крови, содержащий гемоглобин.

Ядродержащие клетки костного мозга – клетки костного мозга, содержащие цельные, сегментированные или полиморфные ядра.

de novo – заново.

Engraftment – сохранение части пересаженных клеток донора в организме реципиента.

ex utero – вне матки.

Exon-skipping (перепрыгивание, выбрасывание экзона) – метод коррекции генных дефектов, сводится к введению в культуру мутантных клеток *in vitro* коротких антисмысловых последовательностей РНК, комплементарных местам сплайсинга первичного РНК–транскрипта.

Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS) – способ сортировки клеток, основанный на флюоресцентном мечении специфических поверхностных антигенов

in situ – на месте.

in utero – в матке.

in silico – компьютерное моделирование биологического феномена.

in vitro – в пробирке, в условиях эксперимента.

in vivo – в живом организме.

iPS-клетки – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки – плюрипотентные клетки, обладающие свойствами эмбриональных стволовых клеток, получаемые трансфекцией дифференцированных соматических клеток генетическими векторами, несущими совокупность генов транскрипционных факторов, индуцирующих и поддерживающих плюрипотентное состояние.

MAPC (multipotent adult precursor cell) – взрослые мультипотентные клетки-предшественники.

NT (nuclear transfer) – перенос ядра.

NT-эмбрионы – (nuclear transfer), реконструированные эмбрионы.

Oct4 – один из главных маркеров эмбриональных стволовых клеток.

SCNT (somatic cell nuclear transfer) – перенос ядра соматической клетки.

Soft-сигналы – информация, обладающая направленным воздействием.

Softwre – программное обеспечение, программа.

The Good Manufacturing Practice (GMP) – совокупность ряда строительных, санитарных и пожарных норм для производства.

2. Условные сокращения

АЛД – адренолейкодистрофия
АФ – анемия Фанкони
ГСК – гемопоэтические стволовые клетки
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ДЦЖК – длинноцепочечные жирные кислоты
ДЭ – дыхательный (респираторный, многорядный реснитчатый) эпителий
ИС – инсерционные сайты
КМ – костный мозг
МВ – муковисцидоз
МДБ – мышечная дистрофия Беккера
МДД – мышечная дистрофия Дюшенна
ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки
мРНК – матричная РНК
МФК – моонуклеарная фракция клеток
МЭФ – мышечные эмбриональные фибробласты
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПЯСК – перенос ядра соматической клетки
РНК – рибонуклеиновая кислота
СКА – серповидно-клеточная анемия
СКЖТ – стромальные клетки жировой ткани
ЦНС – центральная нервная система
ЧЭСК – человеческие эмбриональные стволовые клетки
ЭГК – эмбриональные герминативные клетки
ЭГСК – эмбриональные гибридные стволовые клетки
ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение
ЭСК – эмбриональные стволовые клетки
AAV – (от adeno-associated virus) аденоассоциированный вирус
AFP – маркер энтодермальной принадлежности
AI-эмбрионы – (от artificial insemination) – эмбрионы, полученные вследствие искусственной инсеминации
EGF – эндотелиальный фактор роста
ESC – (от embryonic stem cells) – эмбриональные стволовые клетки
ESC – MV – мембранные везикулы эмбриональных стволовых клеток
Flk1 – маркер мезодермальной принадлежности
GFP – (от green fluorescent protein) – зеленый флюоресцирующий белок
HDAC – (от histone deacetylase) – гистон-деацетилаза
HNA – антитела к ядерному антигену человека
HPC – гемопоэтические клетки
HSC – (от hematopoietic stem cells) – гемопоэтические стволовые клетки
HSV – (от herpes simplex viruses) – герпесвирус
INGN 201 – (Ad5CMV-p53) – препарат, состоящий из рекомбинантного аденовируса и гена *p53* дикого типа

iPS cells – (от induced pluripotent stem cells) – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки
iSCNT – (от interspecies somatic cell nuclear transfer) – межвидовой перенос ядра соматической клетки
IVF-эмбрионы – (от in vitro fertilization) – эмбрионы, полученные вследствие искусственного оплодотворения
LIF – (от leukemia inhibitory factor) – лейкоциингибирующий фактор, необходим для инициации дифференцировки эмбриональных стволовых клеток *in vitro* и формирования эмбрионидных телец
LTR – длинные терминальные повторы
MAPC – (от multipotent adult precursor cell) – взрослые мультипотентные клетки–предшественники
MEL – (от murine erythroleukemia) – эритролейкемия крысы
MHC – главный комплекс гистосовместимости
Mr – (от murine p-major) – ген, экспрессирующийся в клетках эритролейкемии крысы
MV – (от membrane-derived vesicles) – мембранные везикулы
NT – (от nuclear transfer) – перенос ядра
NT-pESC – перенос ядра стволовых клеток партеногенетических эмбрионов
NT-эмбрионы – (от nuclear transfer) – эмбрионы, полученные вследствие переноса ядра соматической клетки в энуклеированный овоцит
PEI – (от polyethyleneimine) – полиэтиленимины
pESC – (от parthenogenetic embryonic stem cells) – стволовые клетки партеногенетических эмбрионов
rAAV – (от recombinant adeno-associated virus) – рекомбинантный аденоассоциированный вирус
SAHA – субероиланилид гидроксамовой кислоты, ингибитор HDAC
SCNT – (от somatic cell nuclear transfer) – перенос ядра соматической клетки
shRNA – (от small hairpin RNA) – малые шпилечные РНК
siRNA – короткая интерферирующая РНК
SOD – супероксиддисмутаза
SCCT – (от spindle-chromosomal complex transfer) – метод переноса веретено-хромосомного комплекса для переноса ядерной ДНК
TSA – трихостатин А, ингибитор HDAC
Tuj1 – маркер эктодермальной принадлежности
VEGF – эндотелиальный фактор роста сосудов
VPA – вальпроевая кислота, ингибитор HDAC
VSV-G, vesicular stomatitis virus – вирус везикулярного стоматита

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

Баранов В.С., Баранов А.Н. Генная терапия моногенных наследственных болезней. Миодистрофия Дюшена // Вопросы медицинской химии. – 2000. – Т. 46, № 3. – С. 279-292.

Бармашева А.А., Шарутина И.А., Николаенко Н.С. и др. Культивирование стромальных клеток костного мозга крысы на коллагене I типа разного происхождения. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – Т. 4, №4. – С. 41-47.

Берсенев А.В. Перспективы трансплантации стромальных клеток костного мозга для лечения муковисцидоза // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2005а. – Т. 1, № 1 – С. 16-17.

Берсенев А.В. Усовершенствование методики клонирования эмбрионов приматов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2005б. – Т. 1, №1. – С. 35-36.

Берсенев А.В. «Stembrid» - новая технология репрограммирования ядра взрослой клетки без использования эмбрионов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006а. – Т. 2, №4. – С. 10-11.

Берсенев А.В. Генетическая индукция репрограммирования ядра соматической клетки установленными факторами // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006б. – Т. 4, №6. – С. 20-22.

Берсенев А.В. Зависимость эффективности клонирования от степени дифференцировки клетки-донора ядра // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006в. – Т 6, №4. – С. 22-23.

Берсенев А.В. Бизнес компания Cytori Therapeutics начинает клинические испытания метода клеточной аутотрансплантации для восстановления молочной железы // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006г. – Т. 1, №3. – С. 33.

Берсенев А.В. Метод генетической коррекции серповидноклеточной анемии через рекомбинацию гомологов в эмбриональных стволовых клетках // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006д. – Т. 3, № 5. – С. 18-19.

Берсенев А.В. Коммерциализация клонирования лошадей – достижение компании Viagen // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006е. – Т. 1, №3. – С. 34.

Богомазова А.Н. NaNog – ключевой фактор на финальных стадиях формирования плюрипотентного статуса // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. 5, №1. – С. 16-17.

Бозо И.Я. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2008. – Т. 3, № 1. – С. 22-23.

Бозо И.Я. Успешная индукция iPS-клеток из нейральных стволовых клеток с помощью комбинации двух факторов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2008. – Т. 3, №3. – С. 16-17.

Бочков Н.П., Никитина В.А., Воронина Е.С., Кулешов Н.П. Методическое пособие по тестированию клеточных трансплантатов на генетическую безопасность // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2009. – Т. 4. – С. 183-190.

Бурунова В.В., Суздальцева Ю.Г., Чеглаков И.Б. и др. Подходы к паспортизации и обеспечение безопасности при работе с клеточными материалами. Британско-российское совещание о сотрудничестве с Европейской Комиссией «Стволовые клетки: законодательство, исследования и инновации. Международные перспективы сотрудничества» (М., 15 марта 2007): Тез. докл. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» <http://www.cbio.ru/>. – С. 21-22.

Воронина Е.С., Гольдштейн Д.В., Ржанинова А.А. и др. Оценка генетической безопасности клеточной терапии. Ежег. Всерос. и междунар. науч. конф. «Стволовые клетки и перспективы их использования в здравоохранении» (М., 30-31 мая 2007): Тез. докл. М., 2007. – С. 92-93.

Глазко Т.Т., Яцышина А.Л., Пидпала О.В., Лукаш Л.Л.: Преемственность цитогенетических характеристик в пассажах эмбриональной герминативной клеточной линии мыши G1 // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – Т. 2, №3. – С. 47-50.

Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение – Москва: Мир, 2002. – 589 с.

Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н. Гипоксия и система крови. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2006. – 142 с.

Григорян А.С. МикроРНК модулируют активность факторов плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток – *NaNog*, *Oct4* и *Sox2* // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2008. – Т. 3, №4. – С. 22-24.

Григорян А.С. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека впервые получены без использования интегрирующей в геном ДНК // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009а. – Т. 4, №2. – С. 19-20.

Григорян А.С. Разработан метод получения iPS-клеток с помощью рекомбинантных белков // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009б. – Т. 4, № 2. – С. 21-23.

Григорян А.С. Новые данные о хромосомных aberrациях, возникающих в эмбриональных стволовых клетках человека в процессе культивирования // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009в. – Т. 4, №1. – С. 19-21.

Григорян А.С. Перепрограммирование соматических клеток человека возможно только с помощью овоцитов человека // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009г. – Т. 4, №2. – С. 15-16.

Григорян А.С. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток и генная терапия в лечении пациентов, инфицированных ВИЧ // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009д. – Т. 4, №3. – С. 33-35.

Григорян А.С. Успешный опыт генной терапии немелкоклеточного рака легких опухолевым супрессором p53: результаты клинических испытаний // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009е. – Т. 4, №4. – С. 23-25.

Деев Р.В., Киселев С.П., Исаев А.А. и др. Опыт создания и применения (1-2 фаза клинических испытаний) препарата на основе гена VEGF// Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. 5, №3. – С. 26.

Еремеев А.В., Светлаков А.В., Полстяной А.М. и др. Получение новой линии ЭСК человека в отсутствие фидера и сыворотки // Доклады академии наук. – 2009. – Т. 426, № 2. – С. 270-272.

Дыгай А.М., Артамонов А.В., Бекарев А.А., Жданов В.В., Зюзьков Г.Н., Мадонов П.Г., Удут В.В. Нанотехнологии в фармакологии. - М.: Издательство РАМН, 2011. – 136 с.

Дыгай А.М., Жданов В.В. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор. Фармакологические аспекты. – М.: Изд-во РАМН, 2010. – 138 с.

Жукоцкий А.В., Мелерзанов А.В. Проблемы контроля качества продукции клеточных технологий // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. 5, №3. – С. 29.

Иванов А.В. Направленное клеточное перепрограммирование является стохастическим процессом и подвержено акселерации // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. 5, №1. – С. 19-21.

Исаев А.И. Конференция «Молекулярная медицина и биобезопасность» (М., 20-21 октября 2005) // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2005. – Т. 2. – С. 70.

Исламов Р.Р. Ризванов А.Л., Гусева Д.С., Киясов А.П. Генная и клеточная терапия нейродегенеративных заболеваний // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – Т. 2, №3. – С. 29-37.

Киселев С.Л., Волчков П.Ю., Филоненко Е.С. и соавт. Молекулярная и клеточная биология линий эмбриональных стволовых клеток человека // Молекулярная медицина. – 2006. – № 2. – С. 6-11.

Киселев С.П. Перепрограммирование соматических клеток без векторной интеграции (аденовирусные, плазмидные векторы) // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. 5, №3. – С. 33.

Корочкин Л.И. Недостаточность репрограммирования ядра гемопоэтической стволовой клетки при его переносе // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006. – Т. 5, №3. – С. 20-21.

Лавров А.В. Трансфекция мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток МСК фактором роста эндотелия сосудов VEGF // Тезисы докладов Британско-российского совещания по стволовым клеткам. – 2007. (<http://gerontology-explorer.ru/4b2022bb-fc96-4738-b4a7-019e5b989a8e.html>).

Лебедев И.Н., Пузырёв В.П. Эпигенетические аспекты безопасности вспомогательных репродуктивных технологий // Генетика. – 2007. – Т. 43, № 9. – С. 1157-1171.

Лебедев И.Н., Саженова Е.А. Эпимутации импринтированных генов в геноме человека: классификация, причины возникновения, связь с наследственной патологией // Генетика. – 2008. – Т. 44., № 10. – С. 1356-1373.

Лелявский А. Дегенерация фетальных трансплантатов у больных хореей Гентингтона: долгосрочные результаты // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – Т. 4, №4. – С. 21-22.

Лелявский А. Успешное применение генной терапии для лечения X-сцепленной формы аденолейкодистрофии // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. 5, №1. – С. 30-32.

Лопатина Т.В. Недостаточность репрограммирования ядра гемопоэтической стволовой клетки при его переносе // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006а. – Т. 1, №3. – С. 20-21.

Лопатина Т.В. Лечение серповидно-клеточной анемии комбинацией методов генной терапии и РНК-интерференции // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006б. – Т. 2, №4. – С. 11-12.

Лопатина Т.В. Передача РНК и белков через мембранные везикулы как один из возможных механизмов репрограммирования и эпигенетических изменений ядра клетки // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006в. – Т. 2, №4. – С. 16-17.

Лопатина Т.В. Сравнительное геномное исследование клонированных и нормальных эмбрионов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006г. – Т. 3, №1. – С. 35-36.

Лопатина Т.В. Гемопоэтическая дифференцировка и терапевтический потенциал унипарентных партеногенетических эмбриональных стволовых клеток // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007а. – Т. 2, №2. – С. 14-15.

Лопатина Т.В. Технология получения партеногенетических линий эмбриональных стволовых клеток комбинацией с методом переноса ядра // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007б. – V. 2, №1. – С. 17-18.

Лопатина Т.В., Калинина Н.И., Парфенова Е.В. Опыт невирусной трансфекции стромальных клеток жировой ткани // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2009. – Т. 2. – С. 73-76.

Макаревич П.И., Шевелев А.Я., Рыбалкин И.Н. и др. Новые плазмидные конструкции, предназначенные для терапевтического ангиогенеза и несущие гены ангиогенных факторов роста – VEGF, HGF и ангиопоэтина-1 // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. 5, №1. – С. 47-52.

Медведев С.П., Малахова А.А., Григорьева Е.В. и др. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток из фибробластов кожи плода человека // Acta Naturae. – 2010. – Т. 2, № 5. – С. 12-14.

Мелихова В.С. Влияние неспецифических ингибиторов ДНК-метилтрансферазы и гистоновой деацетилазы на эффективность репрограммирования эмбриональных фибробластов мышей // Клеточная

трансплантология и тканевая инженерия. – 2008. – Т. 3, №3. – С. 18-19.

Мелихова В.С. Геномные изменения эмбриональных стволовых клеток человека при длительном культивировании // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2005. – Т. 2. – С. 16-17.

Мелихова В.С. По материалам статьи Nayernia K. et al. из Dev Cell. – 2006. V.11, N1. – P.125-132 // <http://newmedicina.info/index13.htm>. – 2006.

Мелихова В.С. Использование митотической зиготы для репрограммирования ядра соматической клетки и клонирования // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007а. – Т. 2, №3. – С. 27-28.

Мелихова В.С. Создание гистосовместимых эмбриональных стволовых клеток методом партеногенеза // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007б. – Т. 2, №1. – С. 18-19.

Мелихова В.С. Эпигенетический контроль развития млекопитающих в отсутствие отцовского генома // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2008. – Т. 3, №1. – С. 21-33.

Мнения специалистов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – Т. 2, №2. – С.6-7.

Наханов А.Х., Мамадалиев С.М., Сембаев К.Д., Битов Н.Т. Выделение и культивирование гемопоэтических стволовых клеток // Ежег. Всерос. и междунар. науч. конф. «Стволовые клетки и перспективы их использования в здравоохранении» (М., 30-31 мая 2007): Тез. докл. М., 2007. – С. 86-87.

Новик П. Показана возможность лечения анемии Фанкони путем генетической коррекции iPS-клеток // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – Т. 4, №4. – С. 6-7.

Павлова Г.В., Мануилова Е.С., Гривенников И.А. и др. Трансформация эмбриональных стволовых клеток с использованием ХИТ-шокового промотора дрозофилы // Цитология. – 2004. – Т. 46, № 10. – С. 933.

Пальцев М.А. Медицина XXI века в свете клеточной биологии // ВРАМН. – 2004. – № 9. – С. 3-11.

Пузырев В.П., Степанов В.А. Патологическая анатомия генома человека. – Новосибирск: Наука, 1997. – 224 с.

Ревещин А.В., Корочкин Л.И., Рыбалкина Е.Ю. и др. Новые подходы к регуляции экспрессии чужеродных генов в стволовых клетках // Тезисы докладов Британско-российского совещания по стволовым клеткам. – 2007. (<http://gerontology-explorer.ru/4b2022bb-fc96-4738-b4a7-019e5b989a8e.html>).

Репин В.С., Сабурин И.Н. Обратимые эпителио-мезенхимальные трансформации клеток в эмбриогенезе и постнатальном обновлении тканей // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2008. – Т. 1, № 3. – С. 64-73.

Ризванов А.А., Гусева Д.С., Салафутдинов И.И. и др. Генно-клеточная терапия бокового амиотрофического склероза мононуклеарными клетками пуповинной крови человека, сверхэкспрессирующими гены нейронной молекулы адгезии L1CAM и сосудистого эндотелиального фактора роста

VEGF // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т.5, № 4. – С. 55-65.

Сабурина И.Н., Горкун А.А., Кошелева Н.В. и др. Сопоставление поведения стромальных клеток пупочного канатика и мультипотентных стромальных клеток взрослого костного мозга в 2-D и 3-D культуре: моделирование стромальной регенерации // Вестник новых медицинских технологий. – 2009. – Т. 16, №1. – С. 9-11.

Сабурина И.Н., Репин В.С. 3D-культивирование: от отдельных клеток к регенерационной ткани (К вопросу о феномене эпителио-мезенхимальной пластичности) // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. 5, №2. – С. 75-86.

Свиридова-Чайлахян Т.А., Чайлахян Л.М. Современные подходы к получению пациент-специфичных линий эмбриональных стволовых клеток // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – Т. 4, №2. – С. 28-31.

Свиридова-Чайлахян Т.А., Чайлахян Л.М. Реконструкция зародышей мышечной ткани как адекватная модель для разработки основ терапевтического клонирования // ДАН. – 2005. – Т. 404, №3. – С. 422-424.

Семченко В.В., Ерениев С.И., Степанова С.С. и др. Трансплантация незрелой нервной ткани в экспериментальной и клинической неврологии. – Омск: ГУИПП Омский дом печати, 2000. – 340 с.

Семченко В.В., Ерениев С.И., Степанов С.С. и др. Нейротрансплантация. – Омск: Омская областная типография, 2004. – 308 с.

Семченко В.В., Степанов С.С., Боголепов Н.Н. Синаптическая пластичность головного мозга (фундаментальные и прикладные аспекты). – Омск: Омская областная типография, 2008. – 408 с.

Сергеев В.С. Изучение иммунологической совместимости клона и клетки донора ядра // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006. – Т. 1, №3. – С. 21-22.

Серов О.Л. Репрограммирование посредством эмбриональных стволовых гибридных клеток. Британско-российское совещание о сотрудничестве с Европейской Комиссией «Стволовые клетки: законодательство, исследования и инновации. Международные перспективы сотрудничества» (М., 15 марта 2007): Тез. докл. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» <http://www.cbio.ru/>. – С. 170.

Смирнихина С.А., Лавров А.В., Бочков Н.П. Динамика элиминации плазмид и экспрессии гена VEGF121, трансфицированного в мезенхимальные стволовые клетки человека разными методами // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. – Т. 1, №1. – С. 17-21.

Стадник В. Результаты клинических испытаний препаратов INN 201 и гендицина, несущих ген p53 // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. 5, №1. – С. 24-25.

Стадник В.В. Разработана эффективная технология для предупреждения наследственных митохондриальных болезней // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – Т. 4, № 4. – С. 12-13.

Старченко А.А., Зинланд Д.А., Третьякова Е.Н. и др. Менеджмент качества медицинской помощи и обоснованность риска при использовании клеточных технологий в системе обязательного медицинского страхования // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. V, №3. – С. 49-50.

Сукач А.Н. Перспективы использования генной и клеточной терапий для лечения мышечных дистрофий // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006. – Т. 2, №4. – С. 44-50.

Темнов А.А., Никольская А.О., Башкина Л.В. и др. Предварительная иммунокоррекция и культивирование клеток костного мозга. Ежег. Всерос. и междунар. науч. конф. «Стволовые клетки и перспективы их использования в здравоохранении» (М., 30-31 мая 2007): Тез. докл. М., 2007. – С. 100-101.

Чайлахян Л.М., Свиридова-Чайлахян Т.А. Клеточная инженерия // Наука в России. – 2001. – Т. 2. – С. 10-15.

Чертков И.Л., Дризе Н.И. Дифференцировочный потенциал стволовых клеток (кроветворных) (проблема пластичности) // ВРАМН, 2005. – № 10. – С. 37-44.

Шалыгина Ю.А., Ефимова О.А., Кругляков П.В. и др. Сравнительный цитогенетический анализ мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток ранних пассажей и лимфоцитов человека // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – Т. 4, №2. – С. 63-69.

Шахбазов А.В., Северин И.Н., Гончарова Н.В. и др. Вирусные векторы для стабильной трансдукции мезенхимальных стволовых клеток человека: системы на основе адено-ассоциированных вирусов и лентивирусов // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2008. – № 4. – С. 216-218.

Шахбазов А.В., Щербин Д.Г., Гончарова Н.В. и др. Нейроны и стромальные стволовые клетки как мишени для поликатионопосредованной трансфекции // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. – Т. 1. – С. 22-25.

Шахов В.П., Хлусов И.А., Дамбаев Г.Ц. и др. Введение в методы культуры клеток, биоинженерии органов и тканей. – Томск: СТТ, 2004. – 386с.

Шевченко Е.К., Макаревич П.И., Цоколаева З.И. и др. Эффективная трансдукция стромальных клеток жировой ткани человека с помощью рекомбинантного аденоассоциированного вируса // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. 5, №1. – С. 60-64.

Шевченко Е.К., Талицкий К.А., Парфенова Е.В. Перспективы повышения эффективности генной терапии сердечно-сосудистых заболеваний: генетически модифицированные клетки // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. 5, №2. – С. 19-28.

Aasen T., Raya A., Barrero M.J. et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes // *Nat. Biotechnol.* – 2008. – V. 26, N11. – P. 1276-1284.

Abdallah B.M., Kassem M. The use of mesenchymal (skeletal) stem cells for treatment of degenerative diseases: current status and future perspectives // *J. Cell Physiol.* – 2009. – V. 218, N1. – P. 9-12.

Aiuti A., Cattaneo F., Galimberti S. et al. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency // *N. Engl. J. Med.* – 2009. – V. 360, N5. – P. 447-458.

Amado R.G., Mitsuyasu R.T., Rosenblatt J.D. et al. Anti-human immunodeficiency virus hematopoietic progenitor cell-delivered ribozyme in a phase I study: myeloid and lymphoid reconstitution in human immunodeficiency virus type-1-infected patients // *Hum. Gene Ther.* – 2004. – V. 15. – P. 251-262.

Amariglio N., Hirshberg A., Scheithauer B.W. et al. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient // *PLoS Med.* – 2009. – V. 6, № 2. – P. 0221-0231.

Asheuer M., Pflumio F., Benhamida S. et al. Human CD34+ cells differentiate into microglia and express recombinant therapeutic protein // *PNAS.* – 2004. – V. 101, N10. – P. 3557-3562.

Ayash L.J., Ratanatharathorn V., Braun T. et al. Unrelated donor bone marrow transplantation using a chemotherapy-only preparative regimen for adults with high-risk acute myelogenous leukemia // *Am. J. Hematol.* – 2007. – V. 82. – P. 6-14.

Azzouz M., Ralph G.S., Storkebaum E. et al. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model // *Nature.* – 2004. – V. 429, N6990. – P. 413-417.

Bajic V., Spremo-Potparevic B., Milicevic Z., Zivkovic L. Deregulated sequential motion of centromeres induced by antitumor agents may lead to genome instability in human peripheral blood lymphocytes // *J. BUON.* – 2007. – V. 12, N1. – C. 77-83.

Baker D.E., Harrison N.J., Maltby E. et al. Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo // *Nat. Biotechnol.* – 2007. – V. 25, N2. – P. 207-215.

Baker M. Tumours spark stem-cell review // *Nature.* – 2009. – V. 457, № 7232. – P. 941.

Bentwich I. Prediction and validation of microRNAs and their targets // *FEBS Lett.* – 2005. – V. 579. – P. 5904-5910.

Bernardo M.E., Zaffaroni N., Novara F. et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms // *Cancer Res.* – 2007. – V. 67, N19. – P. 9142-9149.

Beyhan Z., Lager A.E., Cibelli J.B. Interspecies nuclear transfer: implications for embryonic stem cell biology // *Cell Stem Cell.* – 2007. – V. 1. – P. 502.

Blelloch R., Wang Z., Meissner A. et al. Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus // *Stem Cells*. – 2006. – V. 24. – P. 2007-2013.

Bochkov N.P., Voronina E.S., Kosyakova N.V. et al. Chromosome variability of human multipotent mesenchymal stromal cells // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2007. – V. 143, N1. – P. 122-126.

Boiani M., Gentile L., Gambles V. et al. Variable reprogramming of the pluripotent stem cell marker Oct4 in mouse clones: distinct developmental potentials in different culture environments // *Stem Cells*. – 2005. – V. 23. – P. 1089-1104.

Boulis N.M., Turner D.E., Imperiale M.J., Feldman E.L. Neuronal survival following remote adenovirus gene delivery // *J. Neurosurg.* – 2002. – V. 96, N2. – P. 212-219.

Bowles E.J., Lee J.H., Alberio R. et al. Contrasting effects of in vitro fertilization and nuclear transfer on the expression of mtDNA replication factors // *Genetics*. – 2007. – V. 176, N3. P. 1511-1526.

Boyer L.A., Lee T.I., Cole M.F. et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells // *Cell*. – 2005. – V. 122, N6. – P. 947-956.

Brambrink T., Foreman R., Welstead G. et al. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells // *Stem Cells*. – 2008. – V. 2. – P 151-159.

Brambrink T., Hochedlinger K., Bell G., Jaenisch R. ES cells derived from cloned and fertilized blastocysts are transcriptionally and functionally indistinguishable // *PNAS*. – 2006. – V.103, N4. – P. 933-939.

Brewer S., Williams T. Loss of AP-2alpha impacts multiple aspects of ventral body wall development and closure // *Dev. Biol.* – 2004. – V.267, N2. – P. 399-417.

Brun A.C., Fan X., Bjornsson J.M. et al. Enforced adenoviral vector-mediated expression of HOXB4 in human umbilical cord blood CD34+ cells promotes myeloid differentiation but not proliferation // *Mol. Ther.* – 2003. – V. 8, N4. – P. 618-628.

Burger C., Nash K., Mandel R.J. Recombinant adeno-associated viral vectors in the nervous system // *Hum. Gene Ther.* – 2005. – V. 16, N7. – P. 781-791.

Burns J.S., Abdallah B.M., Schroder H.D., Kassem M. The histopathology of a human mesenchymal stem cell experimental tumor model: support for an hMSC origin for Ewing's sarcoma? // *Histol Histopathol.* – 2008. – V. 23, N10. – P. 1229-1240.

Buzzard J.J., Gough N.M., Crook J.M. et al. Karyotype of human ES cells during extended culture // *Nat. Biotechnol.* – 2004. – V. 22. – P. 381-382.

Byrne J.A. et al. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer // *Nature*. – 2007. – V. 450. – P. 497-502.

Caisander G., Park H., Frej K. et al. Chromosomal integrity maintained in five human embryonic stem cell lines after prolonged in vitro culture // *Chromosome Res.* – 2006. – V. 14, N2. – P. 131-137.

Calin G.A., Sevignani C., Dumitru C.D. et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers // *PNAS.* – 2004. – V. 101, N9. – P. 2999-3004.

Cartier N., Hacein-Bey-Abina S., Bartholomae C.C. et al. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy // *Science.* – 2009. – V. 326, N5954. – P. 818-823.

Cartwright P., McLean C, Sheppard A. et al. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism // *Dev.* – 2005. – V. 132, N5. – P. 885-896.

Chambers I., Colby D., Robertson M. et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells // *Cell.* – 2003. – V. 113, N5. – P. 643-655.

Chambers I., Silva J., Colby D. et al. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development // *Nature.* – 2007. – V. 450, N7173. – P. 1230-1234.

Charames G.S., Bapat B. Cyclooxygenase-2 knockdown by RNA interference in colon cancer // *Int. J. Oncol.* – 2006. – V. 28, N2. – P. 543-549.

Chen T., Zhang Y.-L., Jiang X. et al. Interspecies nuclear transfer reveals that demethylation of specific repetitive sequences is determined by recipient ooplasm but not by donor intrinsic property in cloned embryos // *Mol. Reprod. Dev.* – 2006. – V. 73. – P. 313-317.

Chen Y., He Z.X., Liu A. et al. Embryonic stem cells generated by nuclear transfer of human somatic nuclei into rabbit oocytes // *Cell Res.* – 2003. – V. 13. – P. 251-263.

Chesne P., Adenot P.G., Viglietta C. et al. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells // *Nature Biotechnol.* – 2002. – V. 20. – P.366-369.

Choufani S., Shuman C., Weksberg R. Beckwith-Wiedemann syndrome // *Am. J. Med. Genet. Part C.* – 2010. – V. 154C. – P. 343-354.

Chung Y., Bishop C.E., Treff N.R. et al. Reprogramming of human somatic cells using human and animal oocytes // *Cloning Stem Cells.* – 2009. – V. 11, N2. <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/clo.2009.0004>.

Cibelli J., Lanza R.P., Campbell K.H.S. et al. *Principles of Cloning.* Academic Press, San Diego 2002.

Cibelli J.B., Grant K.A., Chapman K.B. et al. Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates // *Science.* – 2002. – V. 295. – P. 819.

Cole F., Zhang W., Geyra A. et al. Positive regulation of myogenic bHLH factors and skeletal muscle development by the cell surface receptor CDO // *Dev. Cell.* – 2004. – V. 7, N6. – P. 843-854.

Cowan C.A., Atienza J., Melton D.A., Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells // *Science.* – 2005. – V.

309. – P. 1369-1373.

Cowan C.A., Klimanskaya I., McMahon J. et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts // *N. Engl. J. Med.* – 2004. – V. 350, N13. – P. 1353-1356.

Cullen B.R. Does RNA interference have a future as a treatment for HIV-1 induced disease? // *AIDS Rev.* – 2005. – V. 7, N1. – P. 22-25.

Daniel J.C., Smythe W.R. Gene therapy of lung cancer // *Semin. Surg. Oncol.* – 2003. – V. 21, N 3. – P. 196-204.

Dawbarn D., Allen S.J. Neurotrophins and neurodegeneration // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* – 2003. – V. 29, N3. – P. 211-230.

de Wert G., Mummery C. Human embryonic stem cells: research, ethics and policy // *Hum. Reprod.* – 2003. – V. 18, N4. – P. 672-682.

Dean W., Santos F., Stojkovic M. et al. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* - 2001. – V. 98, N 24. – P. 13734-13738.

Delgado R., Regueiro B.J. The future of HIV infection: gene therapy and RNA interference // *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* – 2005. – V. 23(Supl. 2). – P. 76-83.

Do J.T., Scholer H.R. Nuclei of embryonic stem cells reprogram somatic cells // *Stem Cells.* – 2004. – V. 22, N6. – P. 941-949.

Durbeej M., Campbell K.P. Muscular dystrophies involving the dystrophinglycoprotein complex: an overview of current mouse models // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2002. – V. 12. – P. 349-361.

Eckardt S., Leu N.A., Bradley H.L. et al. Hematopoietic reconstitution with androgenetic and gynogenetic stem cells // *Genes and Dev.* – 2007. – V. 21. – P. 409-419.

Kennedy M., Keller GM Hematopoietic commitment of ES cells in culture // *Methods Enzymol.* – 2003. – V. 365. – P. 39-59.

Eggan K., Baldwin K., Taskett M. et al. Mice cloned from olfactory sensory neurons // *Nature.* – 2004. – V. 428, N6978. – P. 44-49.

Egli D., Birkhoff G., Eggan K. Mediators of reprogramming: transcription factors and transitions through mitosis // *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* – 2008. – V. 9. – P. 505-516.

Egli D., Rosains J., Birkhoff G., Eggan K. Developmental reprogramming after chromosome transfer into mitotic mouse zygotes // *Nature.* – 2007. – V. 447. – P. 679-685.

Ehmsen J., Poon E., Davies K. The dystrophin-associated protein complex // *J. Cell Sci.* – 2002. – V. 115. – P. 2801-2803.

Elbashir S.M., Lendeckel W., Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs // *Genes Dev.* – 2001. – V. 15. – P. 188-200.

Ende N., Weinstein F., Chen R., Ende M. Human umbilical cord blood effect on sod mice (amyotrophic lateral sclerosis) // *Life Sci.* – 2000. – V. 67, N1. – P. 53-59.

Evsikov A.V., de Vries W.N., Peaston A.E. et al. Systems biology of the 2-

cell mouse embryo // *Cytogenet. Genome Res.* – 2004. – V. 105, N2-4. – P. 240-250.

Fanning G., Amado R., Symonds G. Gene therapy for HIV/AIDS: the potential for a new therapeutic regimen // *J. Gene Med.* – 2003. – V. 5. – P. 645-653.

Feng B., Jiang J., Kraus P. et al. Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb // *Nat. Cell Biol.* – 2009. – V. 11, N2. – P. 197-203.

Ferrari S., Geddes D.M., Alton E.W. Barriers to and new approaches for gene therapy and gene delivery in cystic fibrosis // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2002. – P. 54, N 11. – P. 1373-1393.

Finsterer J. Hematological manifestations of primary mitochondrial disorders // *Acta Haematol.* – 2007. – V. 118, N2. – P. 88-98.

Froni C., Galli R., Cipelletti B. et al. Resilience to transformation and inherent genetic and functional stability of adult neural stem cells ex vivo // *Cancer Res.* – 2007. – V. 67, N8. – P. 3725-3723.

French A.J., Adams C.A., Anderson L.S. et al. Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts // *Stem Cells.* – 2008. – V. 26, N2. – P. 485-493.

Friedmann A., Strietzel F.P., Marezki B. et al. Histologica assessment of augmented jaw bone utilizing a new collagen barrier membrane compared to a standard barrier membrane to protect a granular bone substitute material // *Clin. Oral Implants. Res.* – 2002. – V. 13, N6. – P. 587-594.

Fulmer T. Low-Rhes approach to Huntington's // *SciBX.* – 2009. – V. 2, N25; doi:10.1038/scibx.2009.993.

Giannelli F., Moscarella S., Giannini C et al. Effect of antiviral treatment in patients with chronic HCV infection and t(14;18) translocation // *Blood.* – 2003. – V. 102, N4. – P. 1196-1201.

Giasson B.I., Duda J.E., Quinn S.M. et al. Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein // *Neuron.* – 2002. – V. 34, N4. – P. 521-533.

Glorioso J.C., Fink D.J. Herpes vector-mediated gene transfer in treatment of diseases of the nervous system // *An. Rev. Microbiol.* – 2004. – V. 58. – P. 253-271.

Gohari S., Gambia C., Healey M. et al. Evaluation of tissue-engineered skin (human skin substitute) and secondary intention healing in the treatment of full thickness wounds after Mohs micrographic or excisional surgery // *Dermatol. Surg.* – 2002. – V. 28, N12. – P. 1107-1114.

Griesenbach U., Geddes D.M., Alton E.W. Advances in cystic fibrosis gene therapy // *Curr Opin Pulm Med.* – 2004. – V. 10, N 6. – P. 542-546.

Guan Y-S., Liu Y., Zou Q. et al. Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in combination with bronchial arterial infusion for treatment of advanced non-small-cell lung cancer, one year follow-up // *J. Zhejiang. Univ. Sci. B.* – 2009. – V. 10, N 5. – P. 331-340.

Hakelien A.M., Landsverk H.B., Robl J.M. et al. Reprogramming fibroblasts to express T-cell functions using cell extracts // *Nat. Biotechnol.* – 2002. – V. 20, N5. – P. 460-466.

Hamatani T., Carter M.G., Sharov A.A. et al. Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development // *Dev. Cell.* – 2004. – V. 6, N 1. – P. 117-131.

Hammond S.M. Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway // *FEBS Lett.* – 2005. – V. 579. – P. 5822-5829.

Han D.M., Swisher S.G., Roth J.A., Komaki R. Induction of p53-regulated genes and tumor regression in lung cancer patients after intratumoral delivery of adenoviral p53 (INGN 201) and radiation therapy // *Clin. Cancer Res.* – 2003. – V. 9. – P. 93.

Hanna J., Markoulaki S., Schorderet P. et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency // *Cell.* – 2008. – V. 133. – P. 250-264.

Hanna J., Saha K., Jaenisch R. Pluripotency and Cellular Reprogramming: Facts, Hypothesis, Unresolved Issues // *Cell.* – 2010. – V. 143. – P. 508-525.

Harper S.Q., Hauser M.A., Dellorusso C. et al. Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy // *Nat. Med.* – 2002. – V. 8. – P. 253-261.

Hayden E.C. Obama overturns stem-cell ban. President's executive order will allow US human embryonic stem-cell research to thrive at last // *Nature.* – 2009. – V. 458, N7235. – P. 130.

He Q., Li J., Bettiol E., Jaconi M.E. Embryonic stem cells: new possible therapy for degenerative diseases that affect elderly people // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* – 2003. – V. 58, N3. – P. 279-287.

Henson N.L., Heaton M.L., Holland B.H. et al. Karyotypic analysis of adult pluripotent stem cells // *Histol. Histopathol.* – 2005. – V. 20, N3. – P. 769-784.

Hill J.M., Syed M.A., Arai A.E. et al. Outcomes of granulocyte colony-stimulating factor administration to patients with severe coronary artery disease // *Circul.* – 2004. – V. 110 (suppl III). – P. 352.

Hochedlinger K., Jaenisch R. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells // *Nature.* – 2002. – V. 415, N6875. – P. 1035-1038.

Hochedlinger K., Jaenisch R. Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy // *N. Engl. J. of Med.* – 2003. – V. 349, N3. – P. 275-286.

Hoffman D.I., Zellman G.L., Fair C.C. et al. Cryopreserved embryos in the United States and their availability for research // *Fertil. Steril.* – 2003. – V. 79, N5. – P. 1063-1069.

Holm T.M., Jackson-Grusby L, Brambrink T. et al. Global loss of imprinting leads to widespread tumorigenesis in adult mice // *Cancer Cell.* – 2005. – V. 8, N4. – P. 275-285.

Huangfu D., Osafune K., Maehr R. et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2 // *Nat. Biotechnol.* – 2008. – V. 26, N11. – P. 1269-1275.

Huelsmann P.M., Rauch P., Allers K. et al. Inhibition of drug-resistant HIV-1 by RNA interference // *Antiviral. Res.* – 2006. – V. 69, N1. – P 1-8.

Huetter G., Nowak D., Mossner M. et al. Long-term control of HIV by CCR5 delta32/delta32 stem-cell transplantation // *The New England Journal of Medicine.* – 2009. – V. 360. – P. 692-698.

Hug K. Motivation to donate or not donate surplus embryos for stem-cell research: literature review // *Fertil. Steril.* – 2008. – V. 89, N2. – P. 263-277.

Hwang W.S., Lee B.C., Lee C.K., Kang S.K. Cloned human embryonic stem cells for tissue repair and transplantation // *Stem Cell Reviews.* – 2005. – V. 2. – P. 99-110.

Hwang W.S., Roh S.I., Lee B.C. et al. Patient-specific embryonic stem cells derived from human SCNT blastocysts // *Science.* – 2005. – V. 308, N5755. – P. 1777-1783.

Hwang W.S., Ryu Y.J., Park J.H. et al. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst // *Science.* – 2004. – V. 303, N5664. – P. 1669-1674.

Ieda M., Fu J-D., Delgado-Olguin P. et al. Direct Reprogramming of Fibroblasts into Functional Cardiomyocytes by Defined Factors // *Cell.* – 2010. – V. 142. – P. 375-386.

Ingman M., Gyllensten U. mtDB: Human Mitochondrial Genome Database, *Commun.* – 2004. – V. 321. – P. 967-974.

Inoue K., Ogonuki N., Miki H. et al. Inefficient reprogramming of the hematopoietic stem cell genome following nuclear transfer // *J. Cell Sci.* – 2006. – V. 119. – P. 1985-1991.

Inoue K., Wakao H., Ogonuki N. et al. Generation of cloned mice by direct nuclear transfer from natural killer T cells // *Curr. Biol.* – 2005. – V. 15, N12. – P. 1114-1118.

Inoue M., Tomizawa K., Matsushita M. et al. Endothelial nitric oxide synthase-11R protein therapy for prevention of cerebral vasospasm in rats: a preliminary report // *Eur. Urol.* – 2006. – V. 49. – P. 161-168.

Inzunza J., Sahlen S., Holmberg K. et al. Comparative genomic hybridization and karyotyping of human embryonic stem cells reveals the occurrence of an isodicentric X chromosome after long-term cultivation // *Mol. Hum. Reprod.* – 2004. – V. 10. – P. 461-466.

Ivanova N., Dobrin R., Lu R. et al. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference // *Nature.* – 2006. – V. 442, N7102. – P. 533-538.

Jankowsky J.L., Fadale D.J., Anderson J. et al. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase // *Hum. Mol. Genet.* 2004. – V. 13, N2. – P. 159-170.

Jankowsky J.L., Slunt H.H., Gonzales V. et al. Persistent amyloidosis

following suppression of Abeta production in a transgenic model of Alzheimer disease // *PLoS Med.* – 2005. – V. 2, N12. – P. 355.

Janowska-Wieczorek A., Majka M., Kijowski J. et al. Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment // *Blood.* – 2001. – V. 98, N10. – P. 3143-3149.

Jeanisch R., Eggan K., Humpherys D. et al. Nuclear cloning, stem cells, and genomic reprogramming // *Cloning Stem Cells.* – 2002. – V. 4. – P. 389-396.

Jiang M., Rubbi C.P., Milner J. Gel-based application of siRNA to human epithelial cancer cells induces RN Ai-dependent apoptosis // *Oligonucleotides.* – 2004. – V. 14, N4. – P. 239-248.

Jingjuan J., Tonghang G., Xianhong T. et al. Experimental cloning of embryos through human-rabbit interspecies nuclear transfer // *Zool. Res.* – 2005. – V. 26. – P. 416-421.

Jorgensen C., Djouad F., Apparailly F., Noel D. Engineering mesenchymal stem cells for immunotherapy // *Gene Ther.* – 2003. – V. 10, N10. – P. 928-931.

Josephson R., Sykes G., Liu Y. et al. A molecular scheme for improved characterization of human embryonic stem cell lines // *BMC Biology.* – 2006. – V. 4. – P. 28.

Josephson R. Molecular cytogenetics: making it safe for human embryonic stem cells to enter the clinic // *Expert. Rev. Mol. Diagn.* – 2007. – V. 7, N4. P. 395-406.

Junker K., Wiethage T., Muller K.M., Thomas M. p53 tumour-suppressor gene in non-small-cell lung cancer with neoadjuvant therapy // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* – 2001. – V. 126, N4. – P. 238-2045.

Jurga M., Markiewicz I., Sarnowska A. et al. Neurogenic potential of human umbilical cord blood: neural-like stem cells depend on previous long-term culture conditions // *J. Neurosci. Res.* – 2006. - V. 83, N4. – P. 627-637.

Kaji K., Norrby K., Paca A. et al. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors // *Nature.* – 2009. – V. 458. – P. 771-775.

Kang H.J., Kim H.S., Zhang S.Y. et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial // *Lancet.* – 2004. – V. 363. – P. 751-756.

Karagiannis T.E., El-Osta A. RNA interference and potential therapeutic applications of short interfering RNAs // *Cancer Gene Ther.* – 2005. – V. 12, N10. – P. 787-795.

Karmenyan A., Shakhbazyan A., Sviridova-Chailakhyan T. et al. Setup picosecond infrared laser for micromanipulation of early mammalian embryos. In: *Inst. of Biophotonics, National Yang-Ming University, editors. LALS-2008. Proceedings of the International Conference on Laser Application in Life Sciences; Decemb 4-6, 2008; Taiwan, Taipei; 2008.* – P. 184.

Kaspar B.K., Llado J., Sherkat N. et al. Retrograde viral delivery of IGF-1

prolongs survival in a mouse ALS model // *Science*. – 2003. – V. 301, N5634. – P. 839-842.

Kawabe S., Munshi A., Zumstein L.A. et al. Adenovirus-mediated wild-type p53 gene expression radiosensitizes non-small cell lung cancer cells but not normal lung fibroblasts // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2001. – V. 77, N2. – P. 185-194.

Kawahara M., Wu Q., Takahashi N. et al. High-frequency generation of viable mice from engineered bi-maternal embryos // *Nat. Biotechnol.* – 2007. – V. 25, N9. – P. 1045-1050.

Kawakami Y., Rodriguez-Leon J., Koth C.M. et al. MKP3 mediates the cellular response to FGF8 signalling in the vertebrate limb // *Nat. Cell Biol.* – 2003. – V. 5, N6. – P. 513-519.

Kennedy D. (Editor-in-Chief) Editorial Retraction // *Science*. – 2006. – V. 311. – P. 335.

Kennedy M., Keller G.M. Hematopoietic commitment of ES cells in culture // *Methods Enzymol.* – 2003. – V. 365. – P. 39-59.

Kim J.B., Zaehres H., Wu G. et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors // *Nature*. – 2008. – V. 454, N7204. – P. 646-650.

Kobayashi T., Nakauchi H. From cell therapy to organ regeneration therapy: generation of functional organs from pluripotent stem cells // *Nihon Rinsho*. – 2011. – V. 69, N 12. – P. 2148-2155.

Kono T., Obata Y., Wu Q. et al. Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood // *Nature*. – 2004. – V. 428, N6985. – P. 860-864.

Kotton D.N., Ma B.Y., Cardoso W.V. et al. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium // *Development*. – 2001. – V. 128. – P. 5181-5188.

Koynova D.K., Jordanova E.S., Milev A.D. et al. Gene-specific fluorescence in-situ hybridization analysis on tissue microarray to refine the region of chromosome 20q amplification in melanoma // *Melanoma Res.* – 2007. – V. 17, N1. – P. 37-41.

Krause D.S., Theise N.D., Collector M.I. et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell // *Cell*. – 2001. – V. 105, N3. – P. 369-377.

Lagarkova M.A., Shutova M.V., Bogomazova A.N. et al. Induction of pluripotency in human endothelial cells resets epigenetic profile on genome scale // *Cell Cycle*. – 2010. – V. 9. – P. 937-946.

Landsverk H.B., Hakelien A.M., Kuntziger T. et al. Reprogrammed gene expression in a somatic cell-free extract // *EMBO Rep.* – 2002. – V. 3, N4. – P. 384-389.

Latchman D.S. Herpes simplex virus-based vectors for the treatment of cancer and neurodegenerative disease // *Curr. Opin. Mol. Ther.* – 2005. – V. 7, N5. – P. 415-418.

Lee B.C., Kim M.K., Jang G. et al. Dogs cloned from adult somatic cells // *Nature*. – 2005. – V. 436. – P. 641.

Li F., Cao H., Zhang Q. et al. Activation of human embryonic gene expression in cytoplasmic hybrid embryos constructed between bovine oocytes and human fibroblasts // *Cloning Stem Cells*. – 2008. – V. 10, N3. – P. 297–306.

Li Y., Dai Y., Dol W. et al. Cloned endangered species takin (*Budorcas taxicolor*) by inter-species nuclear transfer and comparison of the blastocyst development with yak (*Bos grunniens*) and bovine // *Mol. Reprod. Dev.* – 2006. – V. 73. – P. 189-95.

Li Y., McClintick J., Zhong L. et al. Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4 // *Blood*. – 2005. – V. 105, N2. – P. 635-637.

Lin L., Ye Y., Zakeri Z. p53, Apaf-1, caspase-3, and -9 are dispensable for Cdk5 activation during cell death // *Cell Death and Differentiation*. – 2006. – V. 13. – P. 141-150.

Lin S.P., Youngson N., Takada S. et al. Asymmetric regulation of imprinting on the maternal and paternal chromosomes at the Dlk1-Gtl2 imprinted cluster on mouse chromosome 12 // *Nat. Genet.* – 2003. – V. 35. – P. 97-102.

Liu S.V. iPS cells: a more critical review // *Stem Cells Dev.* – 2008. – V. 17, N3. – P. 391-397.

Lowry W.E., Richter L., Yachechko R. et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2008. – V. 105, N8. – P. 2883-2888.

Lukusa T., Fryns J.P. Human chromosome fragility // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2008. – V. 1779, N1. – P. 3-16.

Lyerly A.D., Faden R.R. Embryonic stem cells. Willingness to donate frozen embryos for stem cell research // *Science*. – 2007. – V. 317, N5834. – P. 46-47.

Ma J., Svoboda P., Schultz R.M. et al. Regulation of zygotic gene activation in the preimplantation mouse embryo: global activation and repression of gene expression // *Biol. Reprod.* – 2001. – V. 64, N6. – P. 1713-1721.

Macpherson J.L., Boyd M.P., Arndt A.J. et al. Long-term survival and concomitant gene expression of ribozyme-transduced CD4+ T lymphocytes in HIV-infected patients // *J. Gene Med.* – 2005. – V. 7. – P. 552-564.

Maguire A., High K., Auricchio A. et al. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial // *Lancet*. – 2009. – V. 374, N9701. – P. 1597-1605.

Maherali N., Sridharan R., Xie W. et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution // *Cell Stem Cell*. – 2007. – V. 1. – P. 55-70.

Maitra A., Arking D.E., Shivapurkar N. et al. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells // *Nature genetics*. – 2005. – V. 37, N10. – P. 1099-1103.

Manabe Y., Nagano I., Gazi M.S. et al. Adenovirus-mediated gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor prevents motor neuron loss of transgenic model mice for amyotrophic lateral sclerosis // *Apoptosis*. – 2002. – V. 7, N4. – P. 329-334.

Mandel R.J., Manfredsson F.P., Foust K.D. et al. Recombinant adeno-associated viral vectors as therapeutic agents to treat neurological disorders // *Mol. Ther.* – 2006. – V. 13, N3. – P. 463-483.

Manno C.S., Arruda V.R., Pierce G.F. et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response // *Nat. Med.* – 2006. – V. 12, N3. – P. 342-347.

Markoulaki S., Hanna J., Beard C. et al. Transgenic mice with defined combinations of drug-inducible reprogramming factors // *Nature Biotechnol.* – 2009. – V. 27. – P. 169-171.

Martin B., Golden E., Keselman A. et al. Therapeutic perspectives for the treatment of Huntington's disease: treating the whole body // *Histol. Histopathol.* – 2008. – V. 23, N2. – P. 237-250.

Mateizel I., De Temmerman N., Ullmann U. et al. Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders // *Human Reproduction.* – 2006. – V. 21. – P. 503-511.

Matsumura H., Tada T. Cell fusion-mediated nuclear reprogramming of somatic cells // *Reprod. Biomed. Online.* – 2008. – V. 16, N1. – P. 51-56.

Matsumura H., Tada M., Otsuji T. et al. Targeted chromosome elimination from ES-somatic hybrid cells // *Nat. Methods.* – 2007. – V. 4, N1. – P. 23-25.

May R.C., Plasterk R.H. RNA interference spreading in *C. elegans* // *Methods Enzymol.* – 2005. – V. 392. – P. 308-315.

McCown T.J. Adeno-associated virus (AAV) vectors in the CNS // *Curr. Gene Ther.* – 2005. – V. 5, N3. – P. 333-338.

Meirelles F.V., Bordignon V., Watanabe Y. et al. Complete replacement of the mitochondrial genotype in a *Bos indicus* calf reconstructed by nuclear transfer to a *Bos taurus* oocyte // *Genetics.* – 2001. – V. 158. – P. 351.

Miagkov A., Turchan J., Nath A., Drachman D.B. Gene transfer of baculoviral p35 by adenoviral vector protects human cerebral neurons from apoptosis // *DNA Cell Biol.* – 2004. – V. 23, N8. – P. 496-501.

Michiue H., Tomizawa K., Wei F.Y. et al. NH2-terminal of influenza virus hemagglutinin-2 subunit peptides enhance the anti-tumor potency of poly-arginine-mediated p53 protein transduction // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280. – P. 8285-8289.

Midorikawa Y., Yamamoto S., Ishikawa S. et al. Molecular karyotyping of human hepatocellular carcinoma using single-nucleotide polymorphism arrays // *Oncogene.* – 2006. – V. 25, N40. – P. 5581-5590.

Miranda K.C., Huynh T., Tay Y. et al. A pattern-based method for the identification of microRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes // *Cell.* – 2006. – V. 126. – P. 1203-1217.

Mitalipov S.M., Yeoman R.R., Nusser K.D., Wolf D.P. Rhesus monkey embryos produced by nuclear transfer from embryonic blastomeres or somatic cells // *Biol. Reprod.* – 2002. – V. 66. – P. 1367-1373.

Mitalipova M.M., Rao R.R., Hoyer D.M. et al. Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells // *Nature biotechnol.* – 2005. – V. 23, N1. – P. 19-20.

Mitsui K., Tokuzawa Y., Itoh H. et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells // *Cell.* – 2003. – V. 113, N5. – P. 631-642.

Mitsuyasu R.T., Merigan T.C., Carr A. et al. Phase 2 gene therapy trial of an anti-HIV ribozyme in autologous CD34+ cells // *Nature Medicine.* – 2009. – V. 15. – P. 285-292.

Monani U.R., Sendtner M., Coover D.D. et al. The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn(-/-)* mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy // *Hum. Mol. Genet.* – 2000. – V. 9, N3. – P. 333-339.

Montini E., Cesana D., Schmidt M. et al. The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy // *J. Clin. Invest.* – 2009. – V. 119, N4. – P. 964-975.

Moon C., Oh Y., Roth J.A. Current status of gene therapy for lung cancer and head and neck cancer // *Clin. Cancer Res.* – 2003. – V. 9, N14. – P. 5055-5067.

Morel O., Toti F., Hugel B., Freyssinet J.M. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors // *Curr. Opin. Hematol.* – 2004. – V. 11, N3. – P. 156-164.

Murashov A.K., Chintalgattu V., Islamov R.R. et al. RNAi pathway is functional in peripheral nerve axons // *Faseb. J.* – 2007. – V. 21, N3. – P. 656-670.

Muzyczka N., Berns K. I. *Parvoviridae: the viruses and their replication* // *Fields Virology* Lippincott. New York: Williams & Wilkins; 2001. – P. 2327-2360.

Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K. et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts // *Nat. Biotechnol.* – 2008. – V. 26, N1. – P. 101-106.

Nakamura Y., Wang X., Xu C et al. Xenotransplantation of long-term-cultured swine bone marrow-derived mesenchymal stem cells // *Stem Cells.* – 2007. – V. 25, N3. – P. 612-620.

Naldini L. *Medicine.* A comeback for gene therapy // *Science.* – 2009. – V. 326, N5954. – P. 805-806.

Nayernia K., Nolte J., Michelmann H.W. et al. In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice // *Dev Cell.* – 2006. – V.11, N1. – P.125-132.

Nelson E., Mykitiuk R., Nisker J. et al. Informed consent to donate embryos for research purposes // *J. Obstet. Gynaecol. Can.* – 2008. – V. 30, N9. – P. 824-836.

Nishikawa S.I., Goldstein R.A., Nierras C.R. The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2008. – V. 9, N9. – P. 725-729.

Nishizaki M., Meyn R.E., Levy L.B. et al. Synergistic inhibition of human lung cancer cell growth by adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in combination with docetaxel and radiation therapeutic in vitro and in vivo // *Clin. Cancer Res.* – 2001. – V. 7, N9. – P. 2887-2897.

O'Brien K.F., Kunkel L.M. Dystrophin and muscular dystrophy: past, present, and future // *Mol. Genet. Metab.* – 2001. – V. 74. – P. 75-88.

Ogura A., Inoue K., Ogonuki N. et al. Phenotypic effects of somatic cell cloning in the mouse // *Cloning Stem Cells.* – 2002. – V. 4, N4. – P. 397-400.

Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells // *Nature.* – 2007. – V. 448, N7151. – P. 313-317.

Okita K., Nakagawa M., Hyenjong H. et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors // *Science.* – 2008. – V. 322. – P. 949-953.

Okumura-Nakanishi S., Saito M., Niwa H., Ishikawa F. Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280. – P. 5307-5317.

Oldak T., Kruszewski M., Machaj EX. et al. Optimisation of transfection conditions of CD34+ hematopoietic cells derived from human umbilical cord blood // *Acta Biochim. Pol.* – 2002. – V. 49, N3. – P. 625-632.

Ortiz L.A. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects // *PNAS.* – 2003. – V. 100, N 14. – P. 8407-8411.

Ostermeier G.C., Miller D., Huntriss J.D. et al. Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte // *Nature.* – 2004. – V. 429. – P. 15.

Pai S.I., Lin Y.Y., Macaes B. et al. Prospects of RNA interference therapy for cancer // *Gene Ther.* – 2006. – V. 13, N6. – P. 464-477.

Pan G., Thomson J.A. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency // *Cell Res.* – 2007. – V. 17. – P. 42-49.

Park I.H., Zhao R., West J. et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors // *Nature.* – 2008. – V. 451, N7175. – P. 141-146.

Park J.H., Kim S.J., Lee J.B. et al. Establishment of a human embryonic germ cell line and comparison with mouse and human embryonic stem cells // *Mol. Cells.* – 2004. – V. 17, N2. – P. 309-315.

Parker M.A., Bell M.L., Barlow L.A. Cell contact-dependent mechanisms specify taste bud pattern during a critical period early in embryonic development // *Dev. Dyn.* – 2004. – V. 230, N4. – P. 630-642.

Pawliuk R., Westerman K.A., Fabry M.E. et al. Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy // *Science.* – 2001. – V. 294. – P. 2368-2371.

Peng Z. Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers // *Hum. Gene. Ther.* – 2005. – V. 16, N9. – P. 1016-1027.

Pfeifer A., Ikawa M., Dayn Y., Verma I.M. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos // *PNAS.* – 2002. – V. 99. – P. 2140-2145.

Philonenko E.S., Shutova M.V., Chestkov I.V. et al. Current progress and potential application for human pluripotent stem cells // *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* – 2011. – V. 292. – P. 153-196.

Polejaeva I.A., Chen S.H., Vaught T.D. et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells // *Nature.* – 2000. – V. 407. – P. 86-90.

Prokhorovich M.A., Lagar'kova M.A., Shilov A.G. et al. Cultures of hESM human embryonic stem cells: chromosomal aberrations and karyotype stability // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2007. – V. 144, N1. – P. 126-129.

Provoost V., Pennings G., De Sutter P. et al. Infertility patients' beliefs about their embryos and their disposition preferences // *Hum. Reprod.* – 2009. – V. 24, N4. – P. 896-905.

Punhenveetil G., Scholes J., Carbonell D. et al. Successful correction of the human beta-thalassemia Major phenotype using lentiviral vector // *Blood.* – 2004. – V. 104. – P. 3445-3453.

Qiang L., Fujita R., Yamashita T. et al. Directed conversion of Alzheimer's disease patient skin fibroblasts into functional neurons // *Cell.* – 2011. – V. 146. – P. 359-371.

Rajewsky N. MicroRNA target predictions in animals // *Nature Genet.* – 2006. – V. 38. – P. 8-13.

Ralph G.S., Binley K., Wong L.F. et al. Gene therapy for neurodegenerative and ocular diseases using lentiviral vectors // *Clin. Sci. (Lond).* – 2006. – V. 110, N1. – P. 37-46.

Ralph G.S., Radcliffe P.A., Day D.M. et al. Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model // *Nat. Med.* – 2005. – V. 11, N4. – P. 429-433.

Raoul C., Abbas-Terki T., Bensadoun J.C. et al. Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS // *Nat. Med.* – 2005. – V. 11, N4. – P. 423-428.

Revazova E.S., Turovets N.A., Kochetkova O.D. et al. Patient-specific stem cell lines derived from human parthenogenetic blastocysts // *Cloning and Stem Cells.* – 2007. – V. 9, N3. – P. 432-439.

Reya T., Duncan A.W., Ailles L. et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells // *Nature.* – 2003. – V. 423, N6938. – P. 409-414.

Rideout W.M., Eggan K., Jaenisch A. et al. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome // *Science.* – 2001. – V. 293. – P. 1093-1098.

Rideout W.M., Hochedlinder K., Kyba M. et al. Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy // *Cell*. – 2002. – V. 109, N1. – P. 17-27.

Rodolfa K.T., Eggan K. A transcriptional logic for nuclear reprogramming // *Cell*. – 2006. – V. 126, N4. – P. 652-655.

Rosler E.S., Fisk G.J., Ares X. et al. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions // *Dev. Dyn.* – 2004. – V. 229. – P. 259-274.

Rubio D., Garcia-Castro J., Martin M.C. et al. Spontaneous human adult stem cell transformation // *Cancer Res.* – 2005. – V. 65, N8. – P. 3035-3039.

Ruggiero F., van der Rest M. The collagen superfamily. In: *Top.Curr.Chem.* Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 2005. – P. 36-84.

Rutz S., Scheffold A. Towards in vivo application of RNA interference - new toys, old problems // *Arthritis Res. Ther.* – 2004. – V. 6, N2. – P. 78-85.

Saito Y., Yokota T., Mitani T. et al. Transgenic small interfering RNA halts amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280, N52. – P. 42826-42830.

Sato A., Kono T., Nakada K. et al. Gene therapy for progeny of mito-mice carrying pathogenic mtDNA by nuclear transplantation // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2005. – V. 102. – P. 16765-16770.

Sato K., Hattori S., Irie S., Kawashima S. Spike formation by fibroblasts adhering to fibrillar collagen I gel // *Cell structure and function.* – 2003. – V. 28, N4. – P. 229-241.

Sato N., Meijer L., Skaltsounis L. et al. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor // *Nat. Med.* – 2004. – V. 10, N1. – P. 55-63.

Sazhenova E.A., Lebedev I.N., Ereemeev A.V., Svetlakov A.V. Differential susceptibility of imprinted centers to epimutations under DNA demethylation influence // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2008. V. 16. – Suppl. 2. – P. 260.

Schagen F.H., Ossevoort M., Toes R.E., Hoeben R.C. Immune responses against adenoviral vectors and their transgene products: a review of strategies for evasion // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2004. – V. 50, N1. – P. 51-70.

Schatten G., Prather R., Wilmut I. Cloning claim is science fiction, not science // *Science.* – 2003. – V. 299. – P. 344.

Schmid C., Weisser M., Ledderose G. et al. Doserduced conditioning before allogeneic stem cell transplantation: principles, clinical protocols and preliminary results // *Dtsch. Med. Wochenschr.* – 2002. – V. 127. – P. 2186-2192.

Schmidt M., Schwarzwaelder K., Bartholomae C. et al. High-resolution insertion-site analysis by linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR) // *Nat. Methods.* – 2007. – V. 4, N12. – P. 1051-1057.

Schuler M., Herrmann R., de Greve J.L. et al. Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients receiving chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: results of a multicenter phase II study // *J. Clin. Oncol.* – 2001. – V. 19, N6. – P. 1750-1758.

Scotto L., Narayan G., Nandula S.V. et al. Identification of copy number gain and overexpressed genes on chromosome arm 20q by an integrative genomic approach in cervical cancer: potential role in progression // *Genes Chromosomes Cancer*. – 2008. – V. 47, N9. – P. 755-765.

Sekiya I. et al. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality // *Stem Cells*. – 2002. – V. 20, N 6. – P. 530-541.

Serakinci N., Guldborg P., Burns J.S. et al. Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation // *Oncogene*. – 2004. – V. 23. – P. 5095-5098.

Shimamoto A. Therapeutic application of RNA interference // *Nippon Rinsho*. – 2005. – V. 63, N7. – P. 1291-1297.

Shin J.Y., Suh D., Kim J.M. et al. Low molecular weight polyethylenimine for efficient transfection of human hematopoietic and umbilical cord blood-derived CD34+ cells // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2005. – V. 1725, N3. – P. 377-384.

Shiras A., Chettiar S.T., Shepal V. et al. Spontaneous Transformation of Human Adult Nontumorigenic Stem Cells to Cancer Stem Cells Is Driven by Genomic Instability in a Human Model of Glioblastoma // *Stem Cells*. – 2007. – V. 25. – P. 1478-1489.

Silva J., Barrandon O., Nichols J. et al. Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition // *PLoS Biol*. – 2008. – V. 6, N10. – P. 253.

Silva J., Chambers I., Pollard S., Smith A. Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion // *Nature*. – 2006. – V. 441, N7096. – P. 997-1000.

Silva J., Nichols J., Theunissen T. et al. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state // *Cell*. – 2009. – V. 138. – P. 722-737.

Silva S., Kovalchuk A.L., Kim J.S. et al. Bcl2 accelerates inflammation-induced balb/c plasmacytomas and promotes novel tumors with coexisting (12;15) and t (6;15) translocations // *Cancer Research*. – 2003. – V. 63, N24. – P. 8656-8663.

Simerly C., Dominko T., Navara C. et al. Molecular correlates of primate nuclear transfer failures // *Science*. – 2003. – V. 300. – P. 297.

Skrabal K., Low A.J., Dong W. et al. Determining human immunodeficiency virus coreceptor use in a clinical setting: degree of correlation between two phenotypic assays and a bioinformatic model // *J. Clin. Microbiol*. – 2007. – V. 45. – P. 279-284.

Smith R.A., Miller T.M., Yamanaka K. et al. Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease // *J. Clin. Invest*. – 2006. – V. 116, N8. – P. 2290-2296.

Smits P.O., van Geuns R.J., Poldermans D. et al. Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up // *J. Am. Coll. Cardiol*. – 2003. – V. 42. – P. 2063-2069.

Soldner F., Hockemeyer D., Beard C. et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors // *Cell*. – 2009. – V. 136. – P. 964-977.

Spees J.L., Olson S.D., Ylostalo J., et al. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma // *PNAS*. – 2003. – V. 100, N 5. – P. 2397-2402.

St George J.A. Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors // *Gene Ther.* – 2003. – V. 10, N14. – P. 1135-1141.

Stacey G.N., Masters J.R. Cryopreservation and banking of mammalian cell lines // *Nat. Protoc.* – 2008. – V. 3, N12. – P. 1981-1989.

Stadtfield M., Nagaya M., Utikal J. et al. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration // *Science*. – 2008. – V. 322. – P. 945-949.

Steffann J. et al. Analysis of mtDNA variant segregation during early human embryonic development: a tool for successful NARP preimplantation diagnosis // *J. Med. Genet.* – 2006. – V. 43. – P. 244-247.

Strelchenko N., Kukharenko V., Shkumatov A. et al. Reprogramming of human somatic cells by embryonic stem cell cytoplasm // *Reprod. Biomed. Online*. – 2006. – V. 12, N1. – P.107-111.

Suemori H., Yasuchika K., Hasegawa K. et al. Efficient establishment of human embryonic stem cell lines and long-term maintenance with stable karyotype by enzymatic bulk passage // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* – 2006. – V. 345. – P. 926-32.

Sugawara A., Goto K., Sotomaru Y. et al. Current status of chromosomal abnormalities in mouse embryonic stem cell lines used in Japan // *Comparative Medicine*. – 2006. – V. 56, N1. – P. 33-36.

Sumi T., Tsuneyoshi N., Nakatsuji N. et al. Apoptosis and differentiation of human embryonic stem cells induced by sustained activation of c-Myc // *Oncogene*. – 2007. – V. 26, N38. – P. 5564-5576.

Sun Y.L., Zhou G.Y., Li K.N. et al. Suppression of glucosylceramide synthase by RNA interference reverses multidrug resistance in human breast cancer cells // *Neoplasma*. – 2006. – V. 53, N1. – P. 1-8.

Surani M.A., Barton S.C., Norris M.L. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis // *Nature*. – 1984. – V. 308. – P. 548-550.

Swisher S.G., Roth J.A., Komaki R. et al. Induction of p53-regulated genes and tumor regression in lung cancer patients after intratumoral delivery of adenoviral p53 (INGN 201) and radiation therapy // *Clin. Cancer Res.* – 2003. – V. 9, N1. – P. 93-101.

Szyda A., Paprocka M., Krawczyński A. et al. Optimization of a retroviral vector for transduction of human CD34 positive cells // *Acta Biochim. Pol.* – 2006. – V. 53, N4. – P. 815-823.

Tachibana M., Takeda K., Nobukuni Y. et al. Ectopic expression of MITF, a gene for Waardenburg syndrome type 2, converts fibroblasts to cells with melanocyte characteristics // *Nat. Genet.* – 1996. – V. 14. – P. 50-54.

Tachibana M., Sparman M., Sritanandomchai H. et al. Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells // *Nature*. – 2009. – V. 461. – P. 367-372.

Tada M., Takahama Y., Abe K. et al. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells // *Curr. Biol*. – 2001. – V. 11, N19. – P.1553-1558.

Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // *Cell*. – 2007. – V. 131. – P. 861-872.

Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell*. – 2006. – V. 126, N4. – P. 663-676.

Takei S., Yamamoto M., Cui L. et al. Phenotype-specific cells with proliferative potential are produced by polyethylene glycol-induced fusion of mouse embryonic stem cells with fetal cardiomyocytes // *Cell Transplant*. – 2005. – V. 14, N9. – P. 701-708.

Taranger C.K., Noer A., Sorensen A.L. et al. Induction of dedifferentiation, genome-wide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells // *Mol. Biol. Cell*. – 2005. – V. 16, N12. – P. 5719-5735.

Tay Y.M., Tam W.L., Ang Y.S. et al. MicroRNA-134 modulates the differentiation of mouse embryonic stem cells, where it causes post-transcriptional attenuation of Nanog and LRH1 // *Stem Cells*. – 2008. – V. 26. – P. 17-29.

Taylor B.S., Sobieszczyk M.E., McCutchan F.E., Hammer S.M. The challenge of HIV-1 subtype diversity // *N. Engl. J. Med*. – 2008. – V. 358. – P. 1590-1602.

Taylor R.W., Turnbull D.M. Mitochondrial DNA mutations in human disease // *Nature Rev. Genet*. – 2005. – V. 6. – P. 389-402.

Tecirlioglu R.T., Jitong G., Trounson A.O. Interspecies somatic cell nuclear transfer and preliminary data for horse-cow/mouse iSCNT // *Stem Cell Reviews*. – 2006. – V. 2. – P. 277-288.

Tischkowitz M.D., Hodgson S.V. Fanconi anaemia // *J. Med. Genet*. – 2003. – V. 40. – P. 1-10.

Tolar J., Nauta A.J., Osborn M.J. et al. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells // *Stem Cells*. – 2007. – V. 25, N2. – P. 371-379.

Tolentino M.J., Brucker A.J., Fosnot J. et al. Intravitreal injection of vascular endothelial growth factor small interfering RNA inhibits growth and leakage in a nonhuman primate, laser-induced model of choroidal neovascularization // *Retina*. – 2004. – V. 24, N4. – P. 660.

Tomii R., Kurome M., Ochiai T. et al. Production of cloned pig by nuclear established from mouse adult mature adipocytes // *Biochem. Biophys. Res. Cells*. – 2005. – V. 7, N4. – P. 279-288.

Trounson A. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells // *Endocr. Rev*. – 2006. – V. 27, N2. – P. 208-219.

Urazova O.I., Litvinova L.S., Novitskii V.V., Pomogaeva A.P. Cytogenetic impairments of peripheral blood lymphocytes during infectious mononucleosis // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2001. – V. 131, N4. – P. 392-393.

Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z.P. et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors // *Nature*. – 2010. – V. 463. – P. 1035-1041.

Vogel G. Stem cells: ethical oocytes, available for a price // *Science*. – 2006. – V. 313, N5784. – P. 155.

Von Levetzow G., Spanholtz J., Beckmann J. et al. Nucleofection, an efficient nonviral method to transfer genes into human hematopoietic stem and progenitor cells // *Stem Cells Dev.* – 2006. – V. 15, N2. – P. 278-285.

Wahl D.A., Czernuszka J.T. Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair // *Eur. Cell Mater.* – 2000. – V. 28, N11. – P. 43-56.

Wakayama S., Mizutani E., Kishigami S. et al. Mice cloned by nuclear transfer from somatic and ntes cells derived from the same individuals // *J Reprod Dev.* – 2005. – V.51. – P. 765-772.

Wakayama T., Perry A.C. Cloning of mice. In: Cibelli J.B., Lanza R.P., Campbell K.H. (West MD, ed.). *Principles of Cloning*. San Diego: Academic Press, 2002. - P. 301-341.

Wang W. Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins // *Nature Rev. Genet.* – 2007. – V. 8. – P. 735-748.

Wang Y., Huso D.L., Harrington J. et al. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cells culture // *Cytherap.* – 2005. – V. 7, N6. – P. 509-519.

Weintraub H., Tapscott S.J., Davis R.L. et al. Activation of muscle-specific genes in pigment nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1989. – V. 86. – P. 5434-5438.

Wernig M., Lengner C., Hanna J. et al. A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types // *Nature Biotechnol.* – 2008. – V. 26. – P. 916-924.

Wobus A.M., Boheler K.R. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy // *Physiol. Rev.* – 2005. – V. 85, N2. – P. 635-78.

Woltjen K., Michael I.P., Mohseni P. et al. PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells // *Nature*. – 2009. – V. 458. – P. 766-770.

Wu Y., Huang A.L., Tang N. et al. Specific anti-viral effects of RNA interference on replication and expression of hepatitis B virus in mice // *Chin. Med. J.* – 2005. – V. 118, N16. – P. 1351-1356.

Wua H.,Kima K.J., Mehtac K. et al. Copy number variant analysis of human embryonic stem cells // *Stem Cells*. – 2008. – V. 26, N6. – P. 1484-1489.

www.sbio.ru.

Xia H., Mao Q., Eliason S.L. et al. RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia // *Nat. Med.* – 2004. – V. 10, N8. – P. 816-820.

Xie H., Ye M., Feng R., Graf T. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages // *Cell.* – 2004. – V. 117. – P. 663-676.

Yagi K., Kondo D., Okazaki Y., Kano K. A novel preadipocyte cell line a resource for population genetics and medical sciences // *Nuc. Ac. Res.* – 2006. – V. 34. – P. 749-751.

Yamanaka S. A fresh look at iPS cells // *Cell.* – 2009. – V. 137. – P. 13-17.

Yamanaka S. Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation // *Nature.* – 2009. – V. 460. – P. 49-52.

Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells // *Stem Cell.* – 2007. – V. 1, N1. – P. 39-49.

Ying R.S., Fan X.G., Zhu C. et al. Inhibition of hepatitis B virus replication and expression by RNA interference in vivo // *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* – 2006. – V. 14, N1. – P. 15-18.

Yoo G.H., Moon J., LeBlanc M. et al. Phase 2 trial of surgery with perioperative INGN 201 (Ad5CMV-p53) gene therapy followed by chemoradiotherapy for advanced, resectable squamous cell carcinoma of the oral cavity, oropharynx, hypopharynx, and larynx // *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* – 2009. – V. 135, N9. – P. 869-874.

Young H.E. Existence of reserve quiescent stem cells in adults // *Curr. Topics Microbiol Immunol.* – 2002. – V. 914. – P. 212-214.

Young-Kook Kang, Deog-Bon Koo, Jung Sun Park et al. Typical demethylation events in cloned pig embryos. Clues on species-specific differences in epigenetic reprogramming of a cloned donor genome // *J. Biol. Chem.* - 2001. – V. 276, N 43. – P. 39980-39984.

Yu J., Hu K., Smuga-Otto K. et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences // *Science.* – 2009. – V. 324, N5928. – P.797-801.

Yu J., Vodyanik M.A., He P. et al. Human embryonic stem cells reprogram myeloid precursors following cell-cell fusion // *Stem Cells.* – 2006. – V. 24, N1. – P. 168-176.

Yu J., Vodyanik M.A., Thomson J.A. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells // *Science.* – 2007. – V. 318, N5858. – P. 1917-1920.

Zaehres H., Schöler H.R. Induction of pluripotency: from mouse to human // *Cell.* – 2007. – V. 131, N5. – P. 834-835.

Zhang S., Li Y., Li L. et al. Phase I study of repeated intraepithelial delivery of adenoviral p53 in patients with dysplastic oral leukoplakia // *J. Oral Maxillofac. Surg.* – 2009. – V. 67. – P. 1074-1082.

Zhang X.Y., La Russa V.F., Bao L. et al. Lentiviral vectors for sustained transgene expression in human bone marrow' derived stromal cells // *Mol Ther.* – 2002. – V. 5. (5 Pt 1). – P. 555-565.

Zhang Z.X., Guan L.X., Zhang K. et al. Cytogenetic analysis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells passaged in vitro // *Cell Biol. Int.* – 2007. – V. 31. – P. 645-648.

Zhou H., Wu S., Joo J.Y. et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins // *Cell Stem Cell.* – 2009. – V. 4, N5. – P. 381-384.

Zuccato C, Ciammola A., Rigamonti D. et al. Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease // *Science.* – 2001. – V. 293, N5529. – P. 493-498.

Zuckerman V., Wolynec K., Sionov R.V. et al. Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence // *J. Pathol.* – 2009. – V. 219, N1. – P. 3-15.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие.....	4
Введение.....	5
Биотехнологии и биоинженерия	12
Глава 1. Генная инженерия	13
1.1. Генетическая модификация клеток для регенеративной медицины	
1.2. Посттранскрипционная блокада синтеза белка с помощью РНК-интерференции	
1.3. Вирусная трансфекция	
1.3.1. Аденовирусные векторы	
1.3.2. Аденоассоциированный вирусный вектор	
1.3.3. Вирусные векторы на основе герпесвирусов	
1.3.4. Ретровирусы	
1.3.5. Рекомбинантные ретровирусы	
1.3.6. Рекомбинантные лентивирусы	
1.4. Невирусные системы трансфекции	
1.4.1. Липидная трансфекция плазмиды	
1.4.2. Вектор LP1	
1.4.3. Химическая трансфекция	
1.4.4. Электропорация	
1.4.5. Передача РНК и белков через мембранные везикулы	
1.5. Модуляция активности факторов плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток (Nanog, Oct4 и Sox2) с помощью микроРНК	
1.6. Генетическая модификация стволовых клеток пуповинной крови	
1.7. Перепрограммирование генома дифференцированных клеток	
1.7.1. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPS-клетки) без векторной интеграции	
1.7.2. Индукция репрограммирования ядра соматической клетки «генами маркерами плюрипотентности»	
1.7.3. Перепрограммирование соматических клеток с помощью аденовирусных и плазмидных неинтегрирующихся векторов	
1.7.4. Индукция iPS-клеток из нейтральных стволовых клеток с помощью комбинации двух факторов	
1.7.5. Метод получения iPS-клеток с помощью рекомбинантных белков	
1.7.6. iPS-клетки человека, полученные с помощью плазмидного вектора на основе ядерного антигена-1 вируса Эпштейн-Барр (oriP/EBNA1)	
1.7.7. Влияние неспецифических ингибиторов ДНК-метилтрансферазы и гистоновой деацетилазы на эффективность репрограммирования эмбриональных фибробластов мышей	
1.7.8. Технология репрограммирования ядра взрослой клетки без использования эмбрионов «Stembrid»	
1.7.9. Перепрограммирование соматических клеток человека с помощью овоцитов человека	
1.7.10. Генная инженерия в лечении нейродегенеративных заболеваний	
Глава 2. Генная терапия (Ерениев С.И., Лебедев И.Н., Янин В.Л., Петровский Ф.И., Сосновская Е.В., Клементьев А.В)	66
2.1. Проблема векторов в генной терапии	
2.2. Коррекция генных дефектов	
2.3. Генная терапия мультфакториальных заболеваний	

- 2.4. Генная терапия немелкоклеточного рака легких
- 2.5. Генетическое предупреждение наследственных митохондриальных болезней
- 2.6. Генная терапия анемии Фанкони
- 2.7. Генная терапия X-сцепленной формы аденолейкодистрофии
- 2.8. Генная терапия злокачественных новообразований
- 2.9. Генная терапия критической ишемии нижних конечностей
- 2.10. Генная терапия сердечно-сосудистых заболеваний
- 2.11. Генная терапия нейродегенеративных заболеваний (Новицкий Н.А., Грицаенко О.С., Золотарева З.М.)
 - 2.11.1. Болезнь Альцгеймера
 - 2.11.2. Болезнь Паркинсона
 - 2.11.3. Боковой амиотрофический склероз
 - 2.11.4. Хорея Гентингтона
 - 2.11.5. Спинальная мышечная атрофия
- 2.12. Генная терапия гемофилии
- 2.13. Генная терапия мышечных дистрофий
- 2.14. Генная терапия серповидно-клеточной анемии
- 2.15. Генная терапия пациентов, инфицированных ВИЧ
- 2.16. Генная терапия муковисцидоза

Глава 3. Культивирование клеток

116

- 3.1. Культивирование стромальных клеток костного мозга крысы на коллагене I типа разного происхождения
- 3.2. 3D-культивирование: от отдельных клеток к регенерационной ткани
- 3.3. Хромосомные aberrации, возникающие в эмбриональных стволовых клетках человека в процессе культивирования
- 3.4. Выделение и культивирование гемопоэтических стволовых клеток
- 3.5. Предварительная иммунокоррекция и культивирование клеток костного мозга
- 3.6. Преемственность цитогенетических характеристик в пассажах эмбриональной герминативной клеточной линии мышцы G1

Глава 4. Клонирование клеток и животных

133

- 4.1. Способы клонирования
 - 4.1.1. Технология получения партеногенетических линий эмбриональных стволовых клеток комбинацией с методом переноса ядра
 - 4.1.2. Создание гистосовместимых эмбриональных стволовых клеток методом партеногенеза
 - 4.1.3. Гемопоэтическая дифференцировка и терапевтический потенциал унипарентных партеногенетических эмбриональных стволовых клеток
 - 4.1.4. Репрограммирование посредством эмбриональных стволовых гибридных клеток
- 4.2. Клонирование собаки, оленя
- 4.3. Коммерциализация клонирования лошадей, коров, свиней
- 4.4. Эпигенетический контроль развития млекопитающих в отсутствие отцовского генома
- 4.5. Методика клонирования эмбрионов приматов
- 4.6. Зависимость эффективности клонирования от степени дифференцировки клетки-донора ядра
- 4.7. Репрограммирование ядра гемопоэтической клетки при его переносе
- 4.8. Использование митотической зиготы для репрограммирования ядра соматической клетки и клонирования
- 4.9. Терапевтическое клонирование

- 4.9.1. Современные подходы к получению пациент-специфичных линий эмбриональных стволовых клеток
 - 4.9.1.1. Перспективные потребности в терапевтическом клонировании
 - 4.9.1.2. Мировые тенденции развития терапевтического клонирования
 - 4.9.1.3. Альтернативные подходы в получении пациент-специфичных линий эмбриональных стволовых клеток
 - 4.9.1.4. Состояние исследований по терапевтическому клонированию в России
- 4.10. Потомство, полученное с использованием «искусственных» сперматозоидов, выделенных из эмбриональных стволовых клеток
- 4.11. Сомнения в клонировании животных
 - 4.11.1. Сомнения в чистоте клонирования
 - 4.11.2. Происхождение Долли не обладает стопроцентной генетической достоверностью
 - 4.11.3. Генетические поломки в клетках клонированных животных
 - 4.11.4. Иммунологическая совместимость клона и клетки-донора ядра
 - 4.11.5. Сравнительное геномное исследование клонированных и нормальных эмбрионов
 - 4.11.6. Недостаточность репрограммирования ядра гемопоэтической стволовой клетки при его переносе

Глава 5. Безопасность генных и клеточных технологий

194

- 5.1. Мнение специалистов
- 5.2. Препятствия для клинического использования эмбриональных стволовых клеток
- 5.3. Безопасность применения клеточного материала
 - 5.3.1. Генетическая безопасность клеточной терапии
 - 5.3.2. Сравнительный цитогенетический анализ мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток ранних пассажей и лимфоцитов человека
- 5.4. Паспортизация и обеспечение безопасности при работе с клеточными материалами
- 5.5. Молекулярная медицина и биобезопасность
- 5.6. Проблемы контроля качества продукции клеточных технологий
- 5.7. Менеджмент качества медицинской помощи и обоснованность риска при использовании клеточных технологий в системе обязательного медицинского страхования
- 5.8. Нерешенные вопросы и перспективы безопасности клеточных технологий

Заключение

214

Приложение

220

1. Терминология, используемая в практике генных, клеточных, тканевых и органных технологий

2. Условные сокращения

Библиографический список

240

CONTENT

PREFACE	4
INTRODUCTION	5
Biotechnologies and bioengineering	
The chapter I. Gene engineering	
1.1. Genetic updating of cages for regenerative medicine	
1.2. Posttranscription blockade of synthesis of fiber by means of the RNK – interference	
1.3. Virus transfection	
1.3.1. Adenovirus vectors	
1.3.2. Adeno – association a virus vector	
1.3.3. Virus vectors on a basis herpes viruses (herpes simplex viruses, HSV)	
1.3.4. Retroviruses	
1.3.5. Recombinant retroviruses	
1.3.6. Recombinant lentiviruses	
1.4. Not virus systems transfection	
1.4.1. Lipid transfection of plasmid	
1.4.2. Vector LP1	
1.4.3. Chemical transfection	
1.4.4. Electroporation	
1.4.5. Transfer PHK and fibers through membrane vesicles	
1.5. Modulation of activity of embrional stem cells pluripotencial factors (Nanog, Oct4 and Sox2) with the help microRNA	
1.6. Genetic updating stem cells of umbilical cord blood	
1.7. Reprogramming genome the differentiated calls	
1.7.1. Induced pluripotencial stem cells (iPS – cells) without vector integration	
1.7.2. An induction reprogramming kernels of a somatic cell «genes markers pluripotencial »	
1.7.3. Reprogramming of somatic cages with the help adenoviruses and plasmid not integrated vectors	
1.7.4. An induction of iPS – cages from neuronal stem cells by means of a combination of two factors	
1.7.5. A method of reception of iPS – cages with the help recombinant fibers	
1.7.6. The iPS – cages of the person received with the help plasmid of a vector on the basis of a nuclear antigene – 1 of a virus Epstein – Barr (oriP/EBNA1)	
1.7.7. Influence nonspecific DNA – metiltransferaze inhibitors and histone deacetylase on efficiency reprogramming of mice embrional fibroblasts	
1.7.8. «Stembrid» – new reprogramming technology kernels of an adult cells without use of embryos	
1.7.9. Reprogramming of somatic cells of the person with the help the human ovocytes	
1.7.10. Gene engineering in treatment of neurodegenerative diseases	
Chapter 2. GENE THERAPY (Ereniev S.I.,Petrovsky F.I., Sosnovskya E.V.,Klementiev A.V.)	
2.1. A problem of vectors in gene therapy	
2.2. Corrections of gene defects	
2.3. Gene therapy multifactorial diseases	
2.4. Gene therapy non small cell lung cancer	
2.5. The genetic prevention hereditary mitochondrial illnesses	
2.6. Gene therapy of Fanconi anaemia	
2.7. Gene therapy of the X – linked form adrenoleukodystrophy	

- 2.8. Gene therapy of malignant new growths
- 2.9. Gene therapy of a critical ischemia of the bottom finitenesses
- 2.10. Gene therapy of cardiovascular diseases
- 2.11. Gene therapy neurodegenerative diseases
 - 2.11.1. An Alzheimer's disease
 - 2.11.2. Parkinson Illness
 - 2.11.3. Amyotrophic lateral sclerosis
 - 2.11.4. Trochee Gentington
 - 2.11.5. A spinal muscular atrophy
- 2.12. Gene therapy of a hemophilia
- 2.13. Gene therapy of muscular dystrophies
- 2.14. Gene therapy of an is crescent – cellular anaemia
- 2.15. Gene therapy of the patients infected with a HIV
- 2.16. Gene therapy of mucoviscidosis

Chapter 3. CELLS CULTIVATION

- 3.1. Cultivation of a rat's stromal bone marrow stem cells on collage og I type of a different origin
- 3.2. 3D – cultivation: from separate cells to a reclaiming fabric
- 3.3. The chromosomal aberrations arising in human embrional stem cells in process cultivation
- 3.4. Allocation and cultivation haemopoetic stem cells
- 3.5. Preliminary immunocorrection and cultivation of a bone brain cells
- 3.6. Continuity of cytogenetic characteristics in passages a embrional herminative cellular line of mouse G1

Chapter 4. CLONING OF CELLS AND ANIMALS

- 4.1. Ways of cloning
 - 4.1.1. Technology of reception parthenogenesis lines embrional stem cells a combination with a method of carrying over of a kernel
 - 4.1.2. Creation of histocompatibility embrional stem cells at parthenogenetic method
 - 4.1.3. A haemopoetic differentiation and therapeutic potential unipotent parthenogenetic embrional stem cells
 - 4.1.4. Reprogramming means embrional hybrid stem cells
- 4.2. Cloning of a dog, a deer
- 4.3. Commercialization clonings of horses, cows, pigs
- 4.4. The epigenetic control of development of mammals for lack of fatherly genome
- 4.5. A technique of cloning of embryos of primacies
- 4.6. Dependence of efficiency of cloning on degree of a differentiation of a cage – the donor of a kernel
- 4.7. Reprogramming kernels haemopoetic stem cells at its carrying over
- 4.8. Use of mitotically zygotes for reprogramming kernels of a somatic cage and cloning
- 4.9. Therapeutic cloning
 - 4.9.1. Modern approaches to reception the patient – specific of lines embrional stem cells
 - 4.9.1.1. Perspective requirements for therapeutic cloning
 - 4.9.1.2. World tendencies of development of therapeutic cloning
 - 4.9.1.3. Alternative approaches in reception the patient – specific of lines embrional stem cells
 - 4.9.1.4. A condition of researches on therapeutic cloning in Russia
- 4.10. The posterity received with use "artificial" spermatozoides, allocated from embrional stem cells
- 4.11. Doubts in cloning of animals
 - 4.11.1. Doubts in cleanliness of cloning

- 4.11.2. Origin Dolly does not possess absolute genetic reliability
- 4.11.3. Genetic breakages in cages of the cloned animals
- 4.11.4. Immunologichesky compatibility of a clone and a kernel cage – donor
- 4.11.5. Comparative genome research of the cloned and normal embryos
- 4.11.6. Insufficiency reprogramming kernels haemopoetic stem cells at its carrying over

Chapter 5. SAFETY OF GENE AND CELL TECHNOLOGIES

- 5.1. Opinion of experts
- 5.2. Obstacles for clinical use embrional stem cells
- 5.3. Safety of application of a cellular material
 - 5.3.1. Genetic safety of cellular therapy
 - 5.3.2. The comparative cytogenetic analysis multipotent mesenchymal stromal cells of early passages and human lymphocytes
- 5.4. Certification and safety maintenance at work with cellular materials
- 5.5. Molecular medicine and biosafety
- 5.6. Problems of quality assurance of production of cellular technologies
- 5.7. A quality management of medical aid and validity of risk at use of cellular technologies in system of obligatory medical insurance
- 5.8. Unresolved questions and prospects of safety of cellular technologies

Conclusion

Appendix

- 1. The terminology used in practice gene, cellular, fabric and of body technologies
- 2. Conditional reductions

Bibliographic list

Information about authors

СВЕДЕНИЯ О ТВОРЧЕСКОМ КОЛЛЕКТИВЕ

А.М. Дыгай-заслуженный деятель науки РФ, академик РАМН, доктор медицинских наук, профессор, директор НИИ фармакологии СО РАМН, Томск.

С.И. Ерениев- доктор медицинских наук, профессор кафедры медицины труда и профессиональных заболеваний Омской Государственной медицинской академии, врач-невролог высшей категории, научный сотрудник лаборатории гипоксических повреждений мозга и нейрореабилитации Омского НИЦ СО РАМН, Омск.

И.Н. Лебедев- доктор биологических наук, руководитель лаборатории цитогенетики НИИ медицинской генетики СО РАМН, Томск.

В.Г. Ощепков- заслуженный деятель науки РФ, доктор ветеринарных наук, профессор, ведущий научный сотрудник Всероссийского научно-исследовательского института бруцеллеза и туберкулеза животных Россельхозакадемии, Омск.

В.П. Пузырёв- заслуженный деятель науки РФ, академик РАМН, доктор медицинских наук, профессор, зав. Кафедрой медицинской генетики Сибирского государственного медицинского университета, директор НИИ медицинской генетики СО РАМН, Томск.

В.В. Семченко- доктор медицинских наук, профессор кафедры анатомии, гистологии, физиологии и патологической анатомии института ветеринарной медицины и биотехнологии Омского государственного аграрного университета им. П.А. Столыпина, научный руководитель гистологической лаборатории с электронной микроскопией ВНИИБТЖ Россельхозакадемии, врач- невролог, руководитель лаборатории гипоксических повреждений мозга и нейрореабилитации Омского НИЦ СО РАМН, Омск.

С.С. Степанов- доктор медицинских наук, научный сотрудник кафедры анатомии, гистологии, физиологии и патологической анатомии института ветеринарной медицины и биотехнологии Омского государственного аграрного университета им. П.А. Столыпина, научный сотрудник лаборатории гипоксических повреждений мозга и нейрореабилитации Омского НИЦ СО РАМН, Омск.

В.Н. Ярыгин- академик РАМН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биологии медицинских факультетов Российского национального исследовательского медицинского университета им.Н.И. Пирогова, Москва.

К.Н. Ярыгин-член-корреспондент РАМН, доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории клеточной биологии Института биомедицинской химии им.В.Н. Ореховича РАМН и лаборатории клеточных технологий и тканевой инженерии НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН Москва.

В.В.Семченко, С.И. Ерениев, С.С.Степанов,
А.М. Дыгай, В.Г. Ощепков, И.Н. Лебедев

РЕГЕНЕРАТИВНАЯ БИОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА
Книга I. Генные технологии и клонирование

Коллективная монография

Редакторы: В.П. Пузырёв, К.Н. Ярыгин, В.Н. Ярыгин, В.В. Семченко

Компьютерная верстка: *С.С. Степенов, М.В. Филимонова*

Корректор: *В.В. Семченко*

Ответственный за выпуск: *В.В. Семченко*

Авторы рисунка и монтаж фотографий на обложке:

И.Н. Лебедев, С.С. Степенов, А.Ю Максимовская

Информация об издании:
644122 Омск, ул. Октябрьская,92,
Институт ветеринарной медицины и биотехнологии ОмГАУ,
курс цитологии, гистологии и эмбриологии,
ivm_omgau_gistology@mail.ru,8(3812)23-74-71

Издание осуществляется в рамках программы «Наука и образование»
депутата Омского городского совета
кандидата юридических наук И.А.Антропенко

Научно-образовательный проект
«Современные биоветеринарные технологии и нанотехнологии»
института ветеринарной медицины и биотехнологии
Омского государственного аграрного университета

Сверстано и отпечатано с электронных носителей заказчика
в ГП Омская областная типография. 644070, г. Омск, ул. Декабристов,37.
Заказ 552. Тираж 500экз. Подписано в печать 10.12.11