

ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ КЛОНИРОВАНИЕ: МЕТОДЫ И ВОЗМОЖНОСТИ.

Горпинич И.В.¹, Первушин В.В.¹, Первушина Л.В.¹

¹ ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева», г. Орёл, e-mail: info@oreluniver.ru

Аннотация: В данном обзоре рассматриваются возможности использования в медицине метода репрограммирования взрослых стволовых клеток человека в плюрипотентные (пребывающие в состоянии неполной дифференцировки). Именно плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) обладают способностью при дальнейшем их развитии преобразовываться в структурные компоненты любых органов и систем. Данные клетки не могут развиваться в полноценный организм (эмбрион), что сразу же исключает этический барьер как тормозящий фактор в такого рода исследованиях. Метод индукции репрограммирования стволовых клеток (ИРСК) содержит в себе огромный потенциал для дальнейшего развития терапевтического клонирования как перспективного медицинского направления.

Ключевые слова: терапевтическое клонирование, ИРСК, ПЯСК (перенос ядер соматических клеток), эмбриональные стволовые клетки, индуцированное репрограммирование.

THERAPEUTIC CLONING: METHODS AND POSSIBILITIES.

Gorpinich I.V.¹, Pervushin V.V.¹, Pervushina L.V.¹

¹Orel State University named after Ivan Turgenev, Orel, e-mail: info@oreluniver.ru

Annotation: This article discusses the possibilities of using the method of reprogramming adult human stem cells into pluripotent (in the incomplete differentiation state) in medicine. The stem cells (PSC) that have an opportunity to transform into structural components of any organs and systems during their further evolution. The fact that these cells cannot develop into a single organism (embryo) immediately excludes the ethical barrier as a preventing factor in this kind of researches. In conclusion, the method of stem cell reprogramming induction (SCRI) contains a huge potential for the further development of therapeutic cloning as the perspective medical direction.

Key words: therapeutic cloning, SCRI, SCNT (somatic cell nuclear transfer), embryonic stem cells, induced reprogramming.

Введение. Современная медицина активно разрабатывает и внедряет в практику разнообразные биотехнологии, которые открывают возможности для более полной и точной диагностики и лечения патологических состояний, ранее недоступных для коррекции. Идея регенеративной терапии различных заболеваний с использованием стволовых клеток - одно из магистральных направлений медицинской науки. К перспективным технологиям в контексте данного направления относится терапевтическое клонирование.

Терапевтическое клонирование заключается в получении пациент-специфичных линий эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), обладающих колоссальными возможностями в поддержании и восстановлении здоровья человека. С биологической точки зрения, терапевтическое клонирование – это то же репродуктивное клонирование, но с ограниченным (до 14 дней) сроком роста эмбриона. По прошествии обозначенного временного промежутка процесс размножения клеток приостанавливается. Название метода предопределено тем, что образующиеся в течение двух недель эмбриональные клетки способны в дальнейшем преобразоваться в дифференцированные клетки различных органов: сердца, печени, поджелудочной железы, почек и т.д. Этот факт благоприятствует использованию данного метода в медицине для терапии многих заболеваний [5].

Выделяя стволовые клетки из эмбриона, срок жизни которого не более 3 - 4 дней, их дальнейший алгоритм развития в лабораторных условиях можно спроектировать в любом направлении. В теории, стволовые клетки способны дать начало любой структуре тела человека, способной заместить патологически измененный фрагмент или даже орган. В том случае, если они получены из тканей, взятых у человека, которому выращивают трансплантат (ауто трансплантация), также решается проблема гистосовместимости при пересадке.

Технология искусственного получения эмбриональных стволовых клеток с помощью клонирования активно разрабатывается в комплексе с биохимическими направлениями по созданию специальных питательных сред для культивирования живых тканей.

При ПЯСК осуществляется перенос ядра, извлеченного из соматической клетки пациента, в цитоплазму энуклеированного ооцита, находящегося в метафазе второго деления мейоза. Как результат, развивающийся эмбрион будет генетической копией донора ядра. По достижении стадии бластоцисты, из ее клеточной массы выделяют клонированные ЭСК и производят исследования свойств полученных клеточных культур [1, с. 207].

Проведение экспериментов с использованием яйцеклеток человека затрудняют различные проблемы этического и биомедицинского характера. Это законодательные нюансы, связанные с получением разрешений регулирующих органов, проблема оценки качества образовавшихся в организме клеток, риск возникновения мутаций при генно-инженерных манипуляциях и т.д.

Разработка методик формирования линий стволовых клеток человека, несущих генетический материал пациента (полученных методом ПЯСК), откроет широкие перспективы для дальнейших исследований в области клеточной терапии.

Индукция репрограммирования стволовых клеток (ИРСК) человека в плюрипотентные стволовые клетки происходит при внедрении в клетки исходной культуры генов плюрипотентности, способных вернуть взрослые клетки в эмбриональное состояние.

Лаборатория японского учёного С. Яманаки работала над поиском факторов, поддерживающих в ЭСК программу плюрипотентности. Было найдено несколько десятков генов, активность которых в ЭСК была намного выше, чем в дифференцированных клетках. К моменту исследования уже был открыт и тот факт, что слияние ЭСК и специализированной клетки может дать две плюрипотентные клетки [2].

Вооруженная этим знанием, группа учёных внедрила в клетку фибробласта вектор с 24 генами, заставившими часть клеток дать колонии, подобные стволовым клеткам, и принялась по одному удалять гены из этого набора. В результате был установлен список из четырех генов: c-Myc, Oct4, Sox2 и Klf4 (Nanog и Lin28). Стоит отметить, что схема репрограммирования основана на внедрении в культуру соматических клеток человека ретровирусов, несущих такой генный набор. Полученные клетки, названные индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПСК), возникли в результате вышеупомянутой процедуры, имеющей крайне низкий выход, однако применяемые технологии селекции позволяют обнаружить даже одну перепрограммированную клетку на сотни тысяч. Далее последовала серия работ этой и других лабораторий, в которых исследователи оптимизировали состав перепрограммирующих факторов и способ введения вектора в клетку, чтобы повысить эффективность перепрограммирования и снизить вероятность образования опухолевых клеток в результате вызываемой метаморфозы [3].

Гены Sox2 и Oct4 кодируют ключевые белки, необходимые для пролиферации (деления) и поддержания плюрипотентности стволовых клеток. Продукты генов c-Myc и Klf4 способствуют активации Sox2 и Oct4. Ген c-Myc является протоонкогеном: при его гиперэкспрессии может происходить злокачественная трансформация нормальных клеток. Продукт гена Nanog требуется для индукции плюрипотентности соматических клеток. В последних исследованиях была показана целесообразность замены c-Myc и Klf4 на Lin28 и Nanog. Дальнейшую селекцию культур ИПС клеток проводят по соответствию морфологических (компактность колоний, высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение и т.д.), иммуногистохимических и генетических характеристик с ЭСК человека [4, с. 9].

Получение стволовых клеток методами ИРСК и ПЯСК не является равноценными и по технологии, и по возможным осложнениям. Применение в клеточной терапии методик, основанных на использовании ретровирусной трансфекции и внесения в клетки

протоонкогенов, может представлять опасность. Несмотря на то, что сторонники метода ИРСК уверяют, что указанные проблемы легко преодолимы, сторонники ПЯСК убеждены в необходимости ускорения исследований в наиболее спорных направлениях (использование яйцеклеток человека в ПЯСК и т.д.) для скорейшего внедрения методики переноса ядра, как наиболее перспективной и безопасной. Наряду с этим, пока недостаточно проработаны гарантии безопасности биологического материала при генно-инженерных манипуляциях. Для успешного развития и внедрения в медицинскую практику данных технологий требуется не только детальная разработка вариантов самой методики, но и определение чётких показаний и противопоказаний для ее применения. Кроме того, необходимо наличие совершенных критериев оценки и методов коррекции отдаленных результатов, обучение высококвалифицированных специалистов, совершенствование материальной базы клиник и законодательной базы.

Тем не менее, несмотря на имеющиеся сложности, терапевтическое клонирование отмечается большинством специалистов как одно из наиболее перспективных направлений в заместительной клеточной терапии и, в целом, в мировой научной практике. Важнейшей потребностью сейчас является получение законодательного разрешения на проведение исследований, способствующих стремительному развитию данного направления, и преодоление уже выявленных недостатков и сложностей биомедицинского характера.

Список литературы

1. Учебник для студентов высших учебных заведений / Под ред. акад. РАО Н.В. Чебышева. – М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агенство», 2016. – 640 с.: ил.
2. Masako Tada, Yousuke Takahama, Kuniya Abe, Norio Nakatsuji, Takashi Tada. (2001). Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Current Biology*. 11, 1553-1558;
3. Чугунов А. Нобелевская премия по физиологии и медицине (2012): индуцированные стволовые клетки // Научно-популярный сайт Биомолекула, <https://biomolecula.ru>. [Электронный ресурс]. URL: <https://biomolecula.ru/articles/nobelevskaia-premiia-po-fiziologii-i-mediticine-2012-indutsirovannye-stvolovye-kletki> (дата обращения: 01.06.2020).
4. Кузьмина Е.Ю. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток для геннотерапевтической модели мыши: выпускная квалификационная работа бакалавра. Санкт-Петербург, 2016. 51 с.
5. Лоренс Э. Терапевтическое и репродуктивное клонирование (2011) // [Электронный ресурс]. URL: <https://anido.webnode.com/news/sajt-otkryt> (дата обращения: 27.05.2020)