

# ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ. ЖИВОТНЫЕ.  
Лекция 9



# Основные методы клеточной инженерии



**культивирование**

**гибридизация**

**реконструкция**



*КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕРЕНИЯ. ЖИВОТНЫЕ. Лекция 9*

# **ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ**

# Культуры животных.

## Среды для культивирования



### ЕСТЕСТВЕННЫЕ СРЕДЫ

- Амниотическая, асцитическая жидкость, эмбриональная сыворотка и пр.

### ИСКУССТВЕННЫЕ СРЕДЫ

- Среда Эрла, среда Игла, среда Хенкса, среда 199 и др.
- Обязательное условие наличие незаменимых аминокислот, ростовых факторов (митогены, гормоны) и пр.

# Культуры животных. Методы культивирования



**ПОВЕРХНОСТНОЕ**

- **МОНОСЛОЙНЫЕ КУЛЬТУРЫ**  
методы выращивания на твердых питательных средах (подложках)

**ГЛУБИННОЕ**

- **СУСПЕНЗИОННЫЕ КУЛЬТУРЫ**  
культивирование в жидких питательных средах

# Культуры животных. Классификация по адаптации к жизни *in vitro*.



## ПЕРВИЧНЫЕ

- получают практически из любого органа и культивируют до первого пересева

## ДИПЛОИДНЫЕ

- получают из эмбриональных тканей и сохраняют до 50 пересевов, характеризуются диплоидным набором хромосом

## ПЕРЕВИВАЕМЫЕ

- гетероплоидные культуры, существующие вне организма десятки лет



*КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕРЕНИЯ. ЖИВОТНЫЕ. Лекция 9*

# **ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ**

# Фундаментальные аспекты



## ОРГАННЫЕ КУЛЬТУРЫ

*для изучения закономерностей развития органов, механизмов гистогенеза*

*для изучения способов сохранения жизнеспособности изолированных органов, межтканевых взаимодействий*

## КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК

*для изучения роста и дифференцировки клеток*

*для изучения межклеточных взаимодействий, обмена веществ и т. п.*



# Прикладные аспекты



## ТЕСТИРОВАНИЕ

- изучение механизмов действия лекарственных и косметических средств, пестицидов, консервантов и т. п
- выращивание, идентификации вирусов, получение вакцин

## РЕКОНСТРУКЦИЯ и КЛОНИРОВАНИЕ

- для реконструкции различных тканей и органов (регенеративная медицина)
- для репродуктивного клонирования
- для соматической гибридизации

## БИОСИНТЕЗ и БИОТРАНСФОРМАЦИЯ

- как продуценты ценных веществ: гормонов, ферментов, моноклональных антител и др.



*КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕРЕНИЯ. ЖИВОТНЫЕ. Лекция 9*

# **ТЕСТ-СИСТЕМЫ**

# Культуры в тестировании



## **ПРЕИМУЩЕСТВА по сравнению с тест-системами in vivo:**

- простота культивирования
- возможности контроля и большая воспроизводимость
- сокращение временных и экономических затрат
- возможность прижизненного визуального наблюдения клеток, сохраняющих жизнеспособность в течение всего эксперимента, с помощью микроскопа

## **ТРЕБОВАНИЯ**

- стандартизация качества культуры клеток и тканей (принципы GLP для альтернативных методов: Good Cell Culture Practice (GCCP))

# Культуры клеток как тест-система в доклинических исследованиях



В системе доклинического исследования лекарственных препаратов первым этапом является оценка токсичности соединения для культуры клеток и лабораторных животных

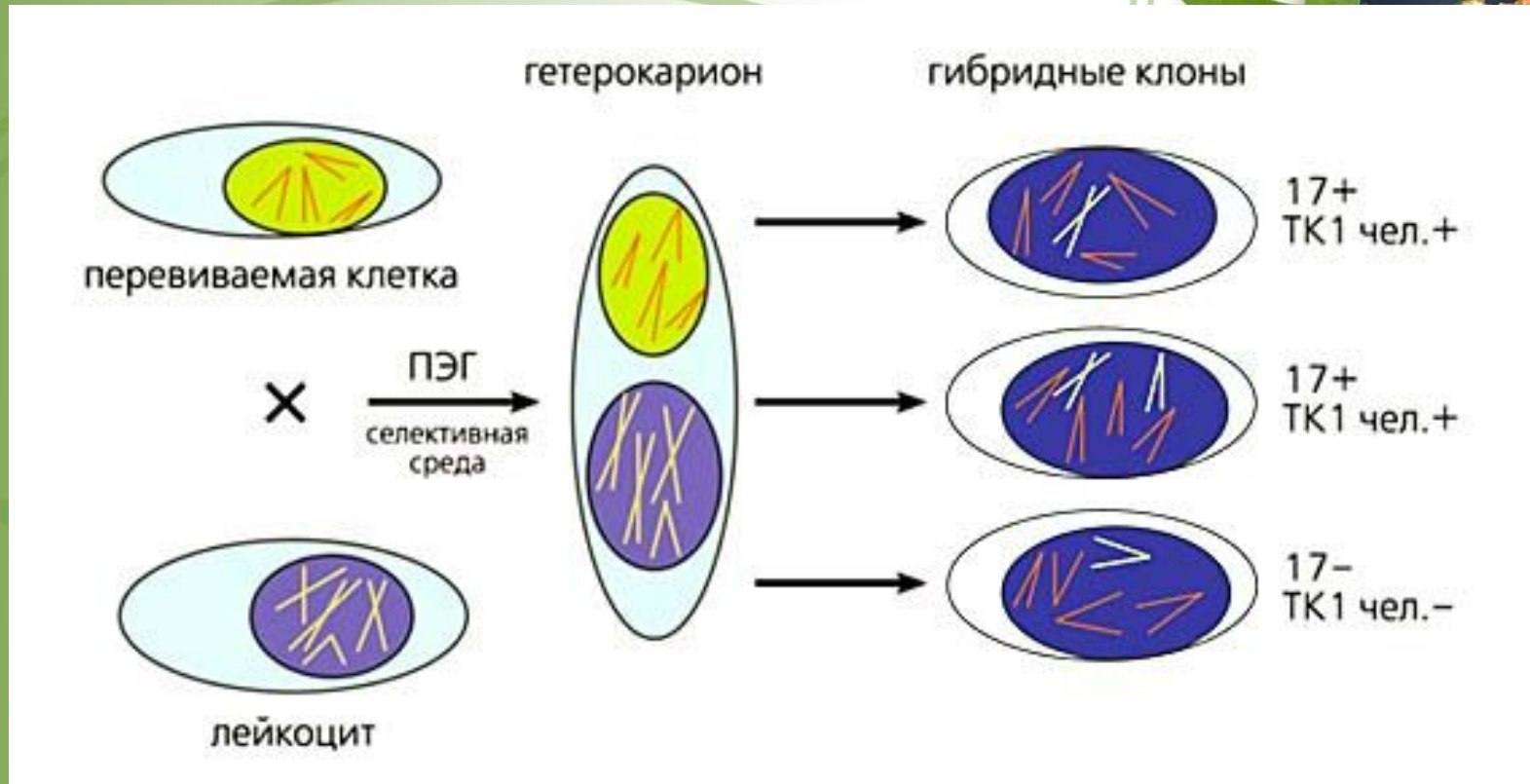




*КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕРЕНИЯ. ЖИВОТНЫЕ. Лекция 9*

# **СОМАТИЧЕСКИЕ ГИБРИДЫ**

# Получение гибридных клонов «человек-мышь»



Клетки мыши и лейкоциты человека обрабатывают полиэтиленгликолем, образуются гетерокарионы, затем формируется гибридная клетка с ядром, содержащим хромосомы обоих родительских видов.

В используемой селективной среде погибают мышинные клетки, не имеющие активного гена ТК1 (необходимого для биосинтеза ДНК), и лейкоциты человека, поскольку без специальных стимуляторов они *in vitro* не делятся. Выживают только гибридные клетки, в которые лейкоциты внесли ген ТК1.

# Соматические гибриды. Применение.



## НА ГЕТЕРОКАРИОНАХ И СОМАТИЧЕСКИХ ГИБРИДАХ

### ИЗУЧАЮТ:

- реактивацию геномов
- активацию и подавление экспрессии генов, роль в этих процессах ядра и цитоплазмы

### СОСТАВЛЯЮТ:

- карты хромосом



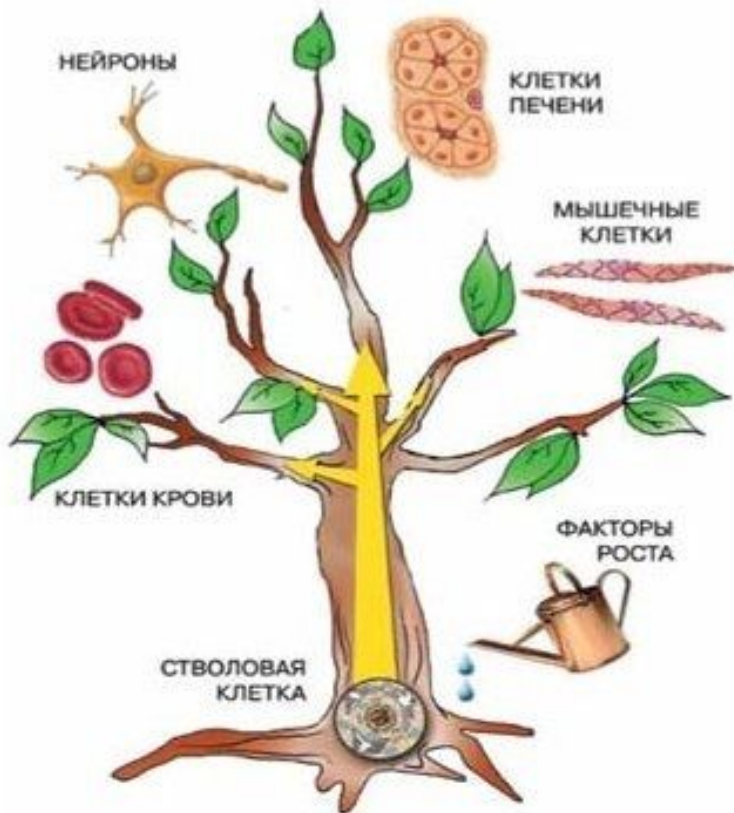
*КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕРЕНИЯ. ЖИВОТНЫЕ. Лекция 9*

# **РЕКОНСТРУКЦИЯ. СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ**



# История открытия. Появление термина.

1908 г. – появление термина «стволовые клетки»  
гистолог А.А. Максимов исследуя развитие клеток крови создал теорию стволовых клеток



Александр Александрович  
Максимов

*Доклад «Лимфоцит как общая стволовая клетка различных элементов крови в эмбриональном развитии и постфетальной жизни млекопитающих» в 1909 г. в Берлине на заседании гематологов*

# История открытия. Исследования.



**1960-х гг.**

**канадские ученые Эрнест Мак-Кулох и Джеймс Тилл  
нашли кроветворные (гемопоэтические) стволовые  
клетки в костном мозге**

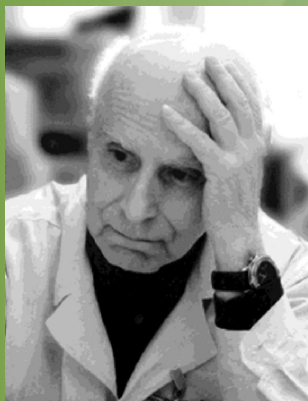


**Drs. James Till and Ernest McCulloch**

# История открытия. Исследования.

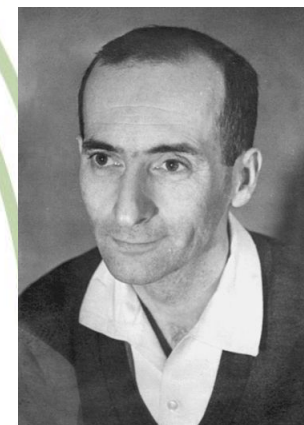


1970-е гг. А.Я. Фриденштейн и И.Л. Чертков заложили основы науки о стволовых клетках костного мозга, открыв гемопоэтические и стромальные стволовые клетки («переоткрытые» в 1990-х гг. американцами)



Иосиф Львович  
Чертков

*Монография «Клеточные основы  
кровообразования (кроветворные  
клетки предшественники)», 1977 г.*



Александр Яковлевич  
Фриденштейн

# История открытия. Исследования.



Джеймс Томсон



Джон Герхарт



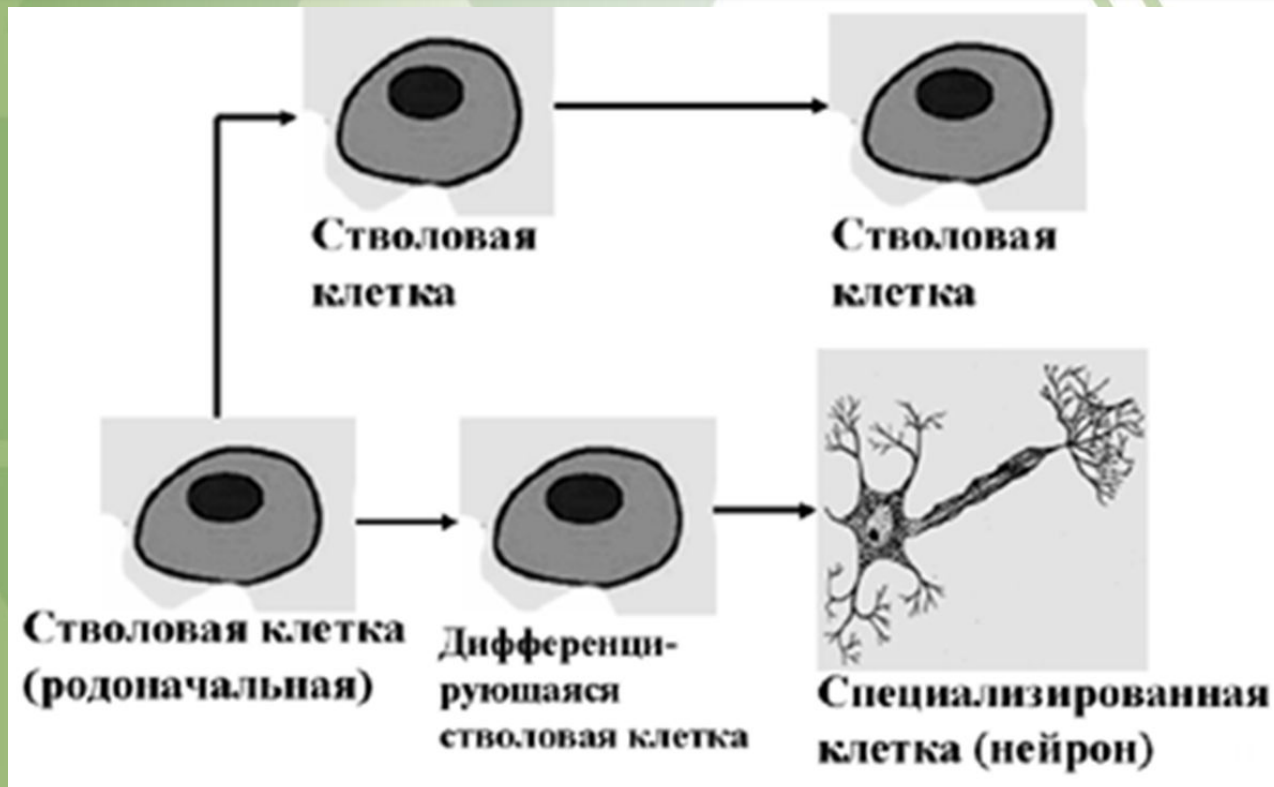
**1998 г. публикация статей о выделении эмбриональных стволовых клеток из бластоцисты человека Джеймс Томсон в журнале Science Джон Герхарт в Анналах национальной академии США**

*По утверждению журнала Science выделение и размножение в питательной среде эмбриональных стволовых клеток является третьим по значимости открытием в биологии (после расшифровки двойной спирали ДНК и завершения научной программы «Геном человека»).*

# Стволовые клетки. Определение термина.



это недифференцированные клетки, способные как к самоподдержанию, так и к дифференцировке в зрелые специализированные клетки



# Стволовые клетки. Свойства.



1

- **Пролиферация** – способность к делению

2

- **Миграция** – способность выходить из депо и циркулировать в биологических жидкостях организма

3

- **Хоминг** – способность находить зону для репарации или построения ткани

4

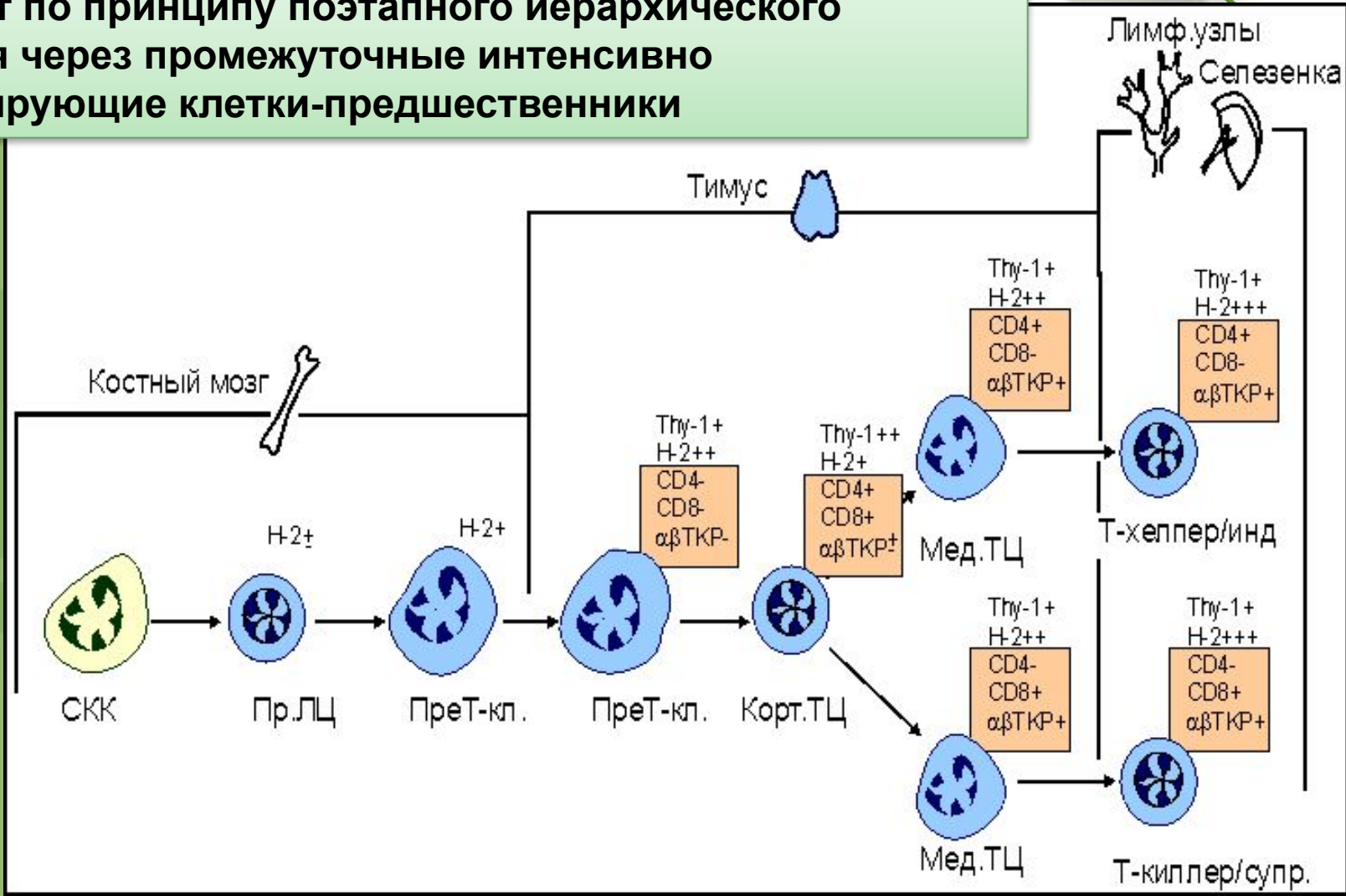
- **Пластичность** – способность дифференцироваться при миграции в зависимости от специфичности органа или ткани

# Стволовые клетки. Свойства.

## Дифференцировка.



дифференцировка большинства типов стволовых клеток происходит по принципу поэтапного иерархического созревания через промежуточные интенсивно пролиферирующие клетки-предшественники



# Стволовые клетки. Классификация по способности к дифференциации.



**Потентность** – это способность стволовых клеток давать начало зрелым (специализированным, дифференцированным) клеточным линиям

**Тотипотентные** – клетки способные к при определенных условиях развиться до целого организма

**Плюрипотентные** – клетки способные дифференцироваться во все типы клеток, кроме клеток внезародышевых органов (плаценты и желточного мешка)

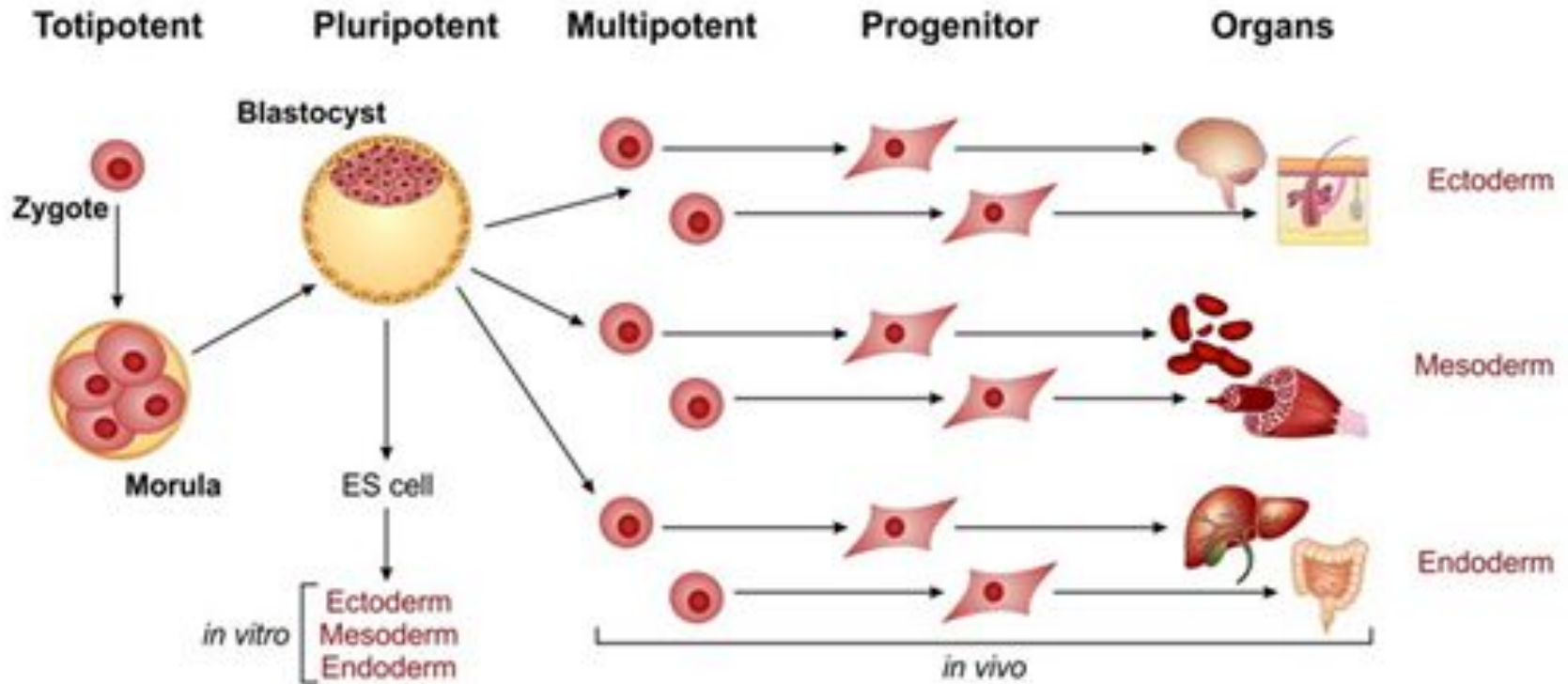
**Мультипотентные** – клетки способные дифференцироваться в разные типы зрелых клеток одного вида ткани

**Полипотентные** – клетки способные давать до 5 линий развития

**Унипотентные** – клетки способные дифференцироваться только в один тип клеток



# Классификация по способности к дифференциации



**Тотипотентные клетки:** программа тотипотентности существует в ооците, зиготе и 2-8 - клеточных бластомерах.

**Плюрипотентные клетки:** клетки эмбриона и внезародышевых оболочек (до 11 дня после оплодотворения, период имплантации зародыша в стенку матки).

**Мультипотентные клетки:** до 8 недели развития эмбриона включительно

# **Стволовые клетки. Классификация по источнику для получения.**

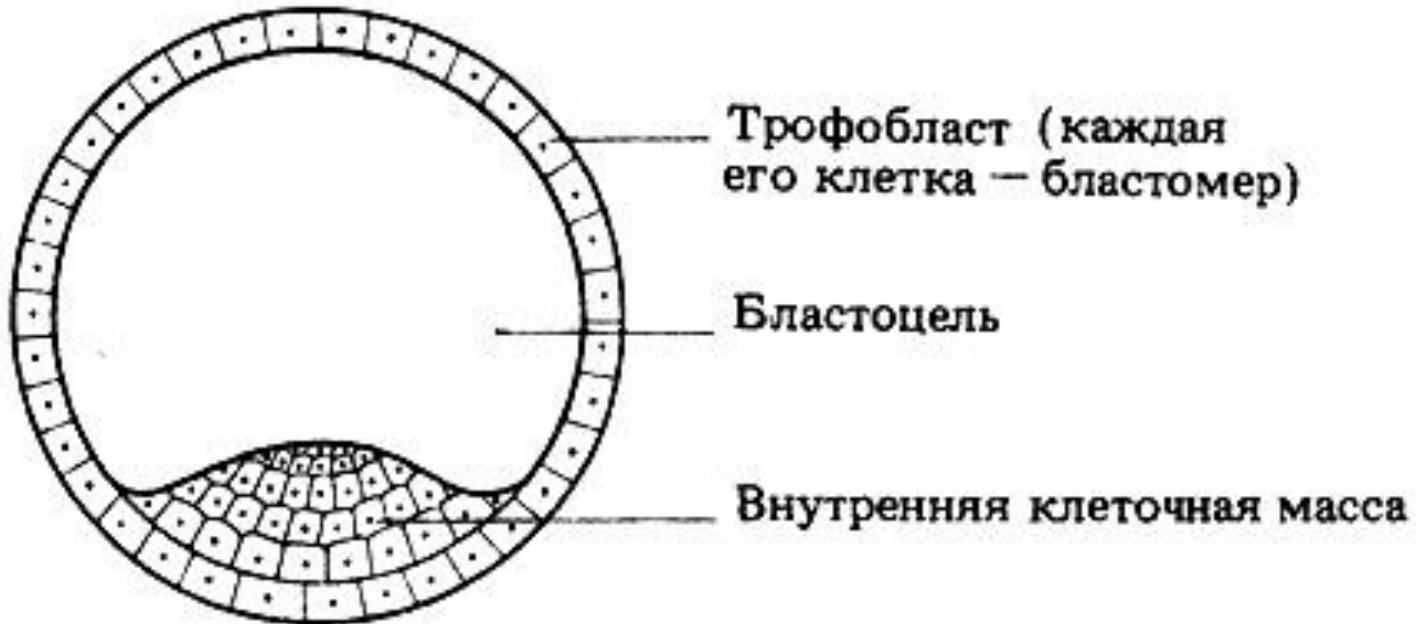


- **Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК)**
- **Фетальные стволовые клетки**
- **Стволовые клетки взрослого организма**
  - а.) **Гемопозитические стволовые клетки (ГСК)**
  - б.) **Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК)**
  - г.) **Тканеспецифичные стволовые клетки**

# Классификация по источнику выделения. Эмбриональные.



образуют внутреннюю клеточную массу, или эмбриобласт, на ранней стадии развития эмбриона, являются плюрипотентными, не экспрессируют HLA антигены



# Эмбриональные СК

выделяют из внутренней массы  
бластоцисты предимплантированного  
зародыша (гестация 5-10 дней)

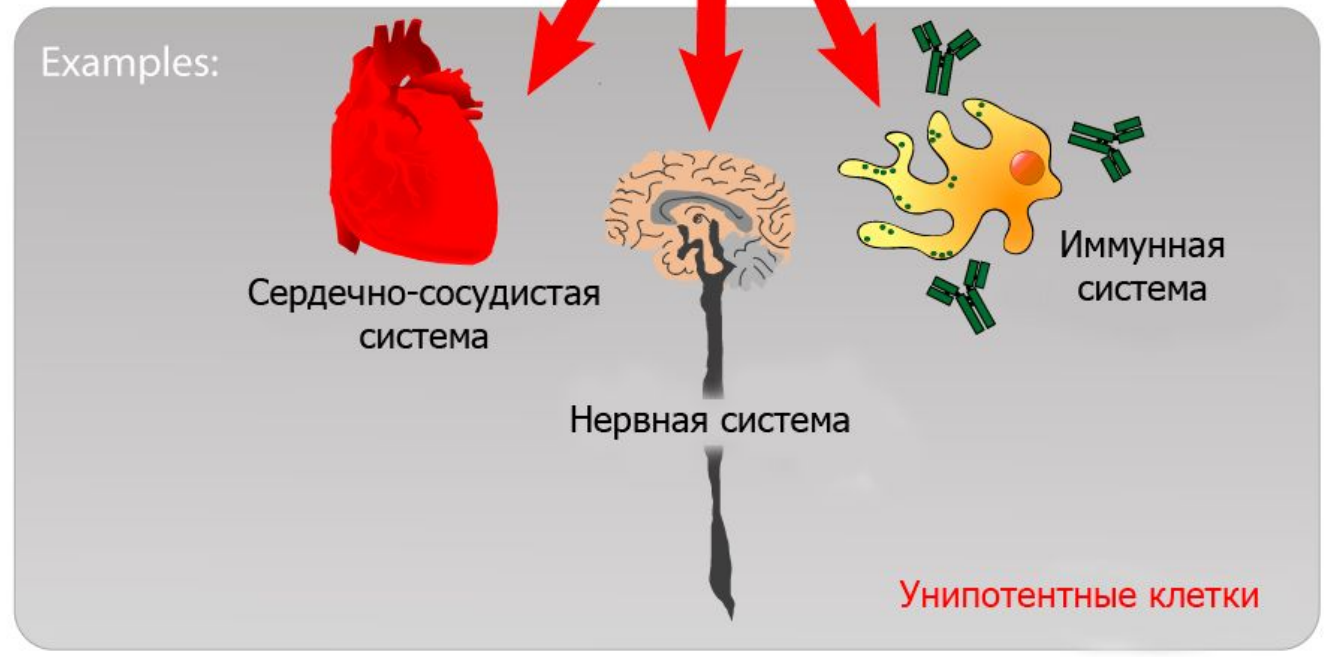
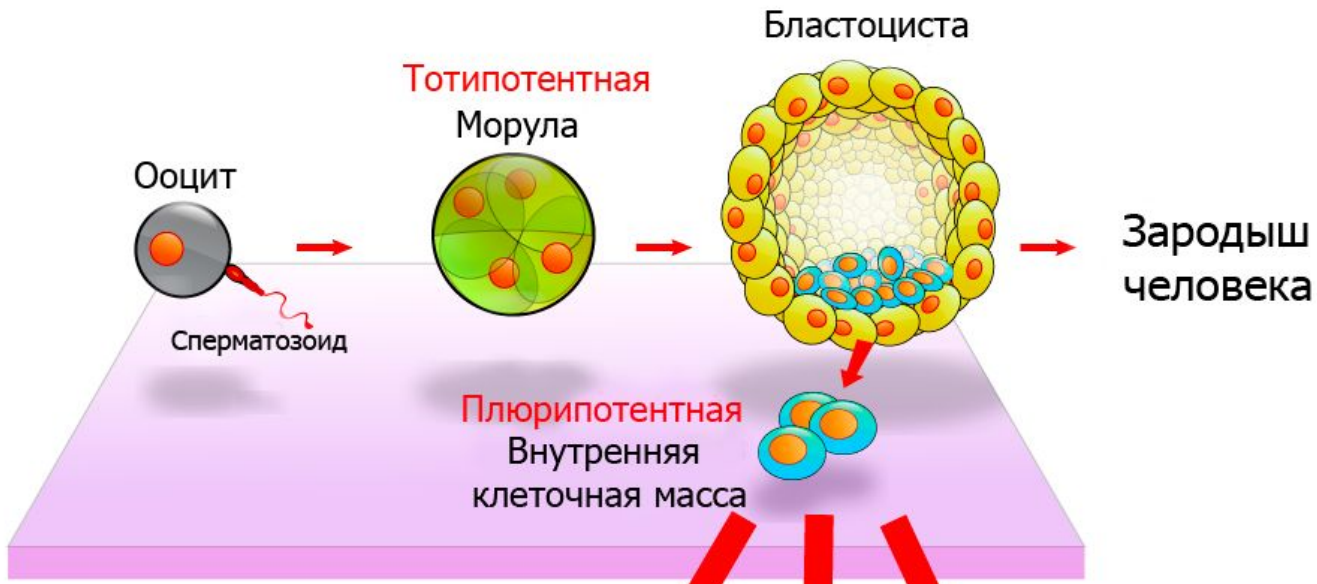
## Характеристика:

- 1.могут генерировать до 300 популяций
- 2.стабильный диплоидный кариотип
- 3.высокая теломеразная активность
4. минимальный фенотип
5. рост клонами



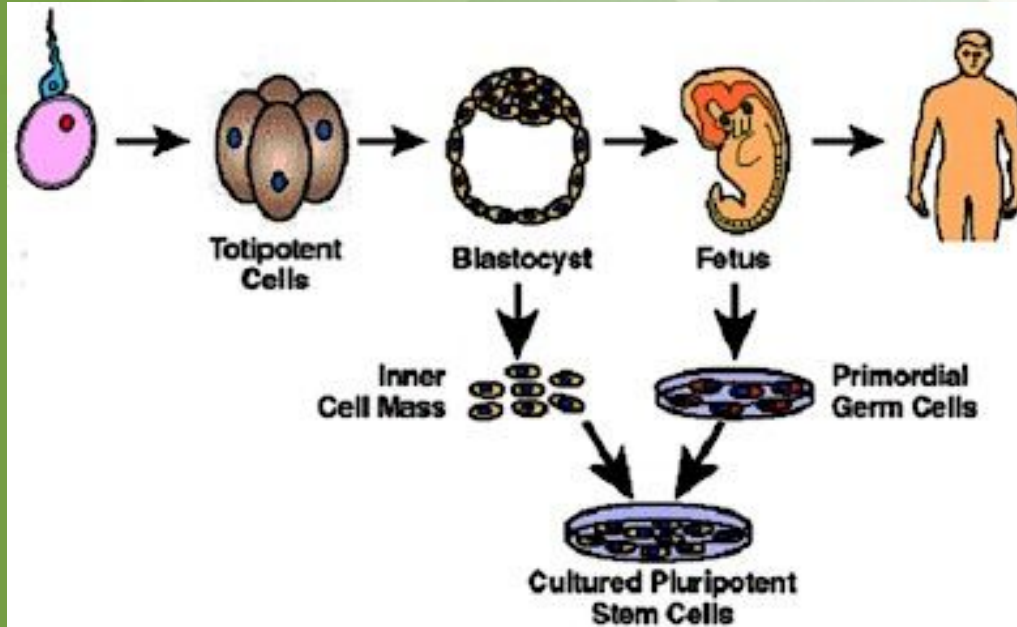
## Получение:

- 1.из бластоцисты отбирают внутреннюю клеточную массу
- 2.помещают ее в чашку Петри с клетками-кормилицами
- 3.культивируют несколько дней в чашке до образования колоний эмбриональных стволовых клеток.



# Фетальные СК

частично детерминированные клетки определенных тканей сформировавшегося фетуса (гестация от 6 до 24 недель)



## Характеристика:

1. могут специализироваться в 1-3 направлениях
2. частично маркированы МНС
3. активно пролиферируют

## Получение:

1. из абортивного материала
2. помещают на питательные среды
3. культивируют несколько дней в чашке до образования колоний фетальных стволовых клеток.

# Стволовые клетки взрослого организма



## СОСТАВ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

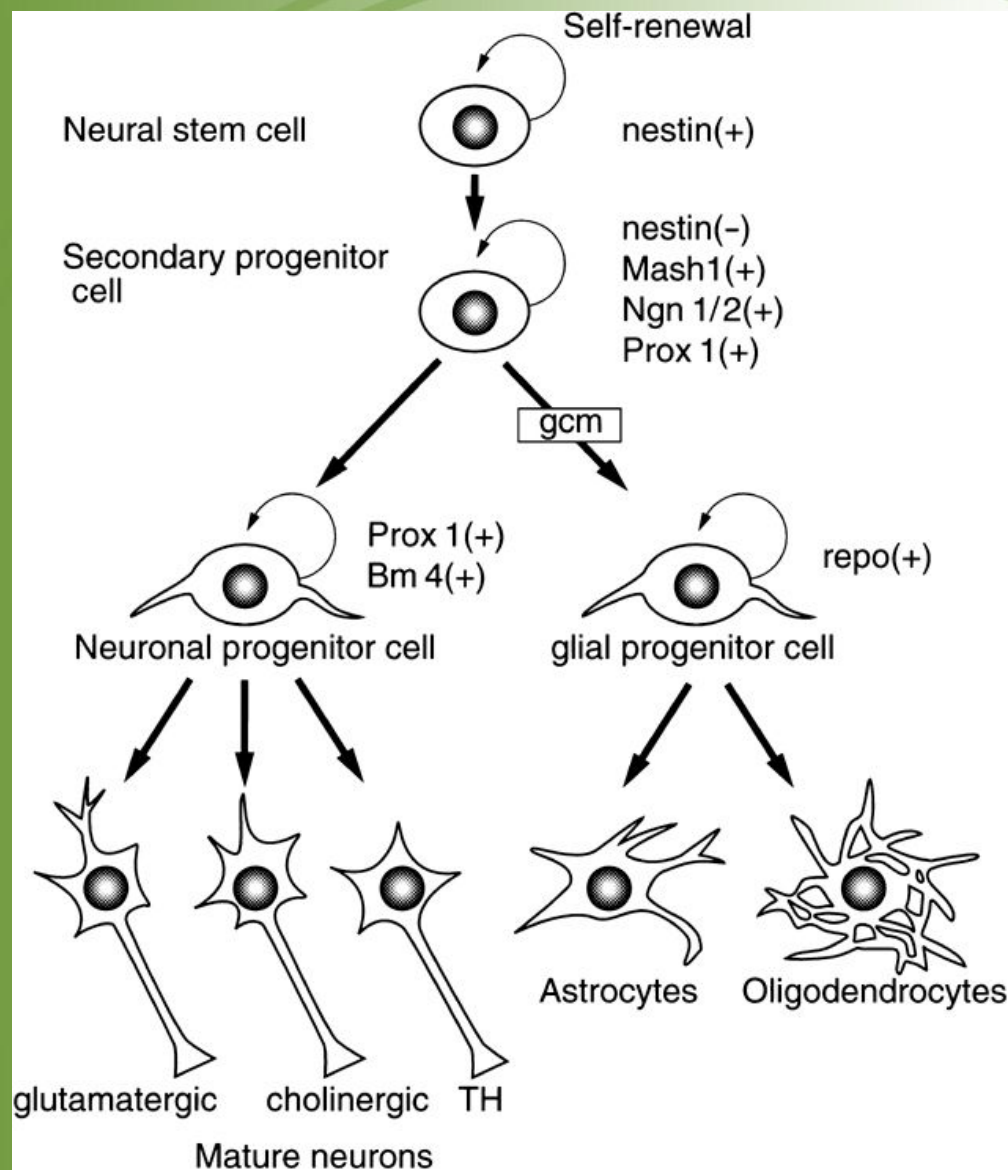




<b>Тип стволовых клеток</b>	<b>Локализация</b>	<b>Путь дифференцировки</b>
<b>Мезенхимальные</b>	Костный мозг, жировая ткань	Кардиомиоциты, миоциты, гладкомышечные клетки, астроглия, костная, хрящевая, стромальная ткани, нервные клетки, эндотелий?
<b>Кроветворные</b>	Костный мозг, селезенка (грызуны)	Эритроциты, гранулоциты, моноциты-макрофаги, остеокласты, клетки Купфера, дендритные клетки, лимфоциты, тромбоциты
<b>Нейральные</b>	Головной мозг, кожа	Нейроны, астроциты, олигодендроциты, клетки крови
<b>Эпителиальные</b>	Кожа, эпидермис	Все типы клеток в эпителиальных криптах, все типы клеток эпидермального слоя
<b>Печёночные</b>	Печень	Гепатоциты, эпителий желчных протоков, кишечный эпителий, клетки поджелудочной железы, миоциты
<b>Дермальные</b>	Кожа, слизистые	Нейроны, глия, гладкие миоциты, адипоциты

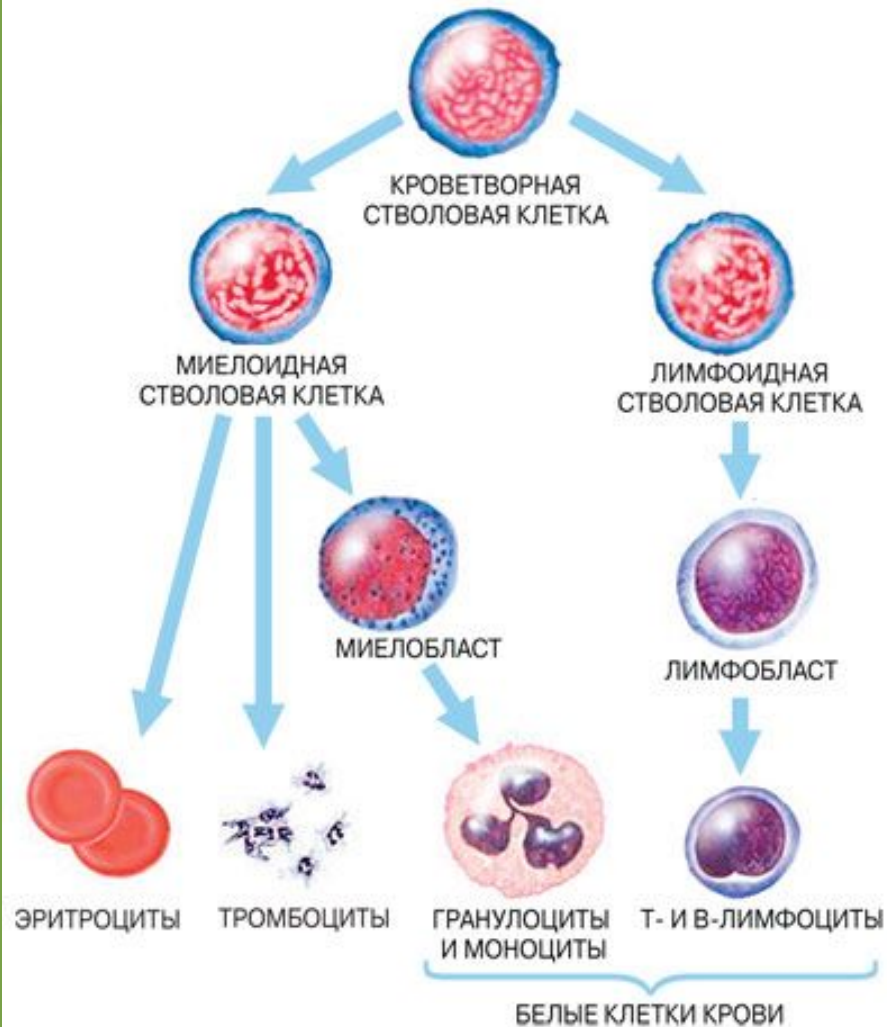


# СК тканевые предшественники



**Тканеспецифичные прогениторные клетки (клетки-предшественницы) – стволовые клетки, детерминированные на дифференцировку в определённый тип клеток, располагаются в различных тканях и органах, отвечают за обновление их клеточной популяции, то есть замещают погибшие клетки.**

# Стволовые кроветворные клетки

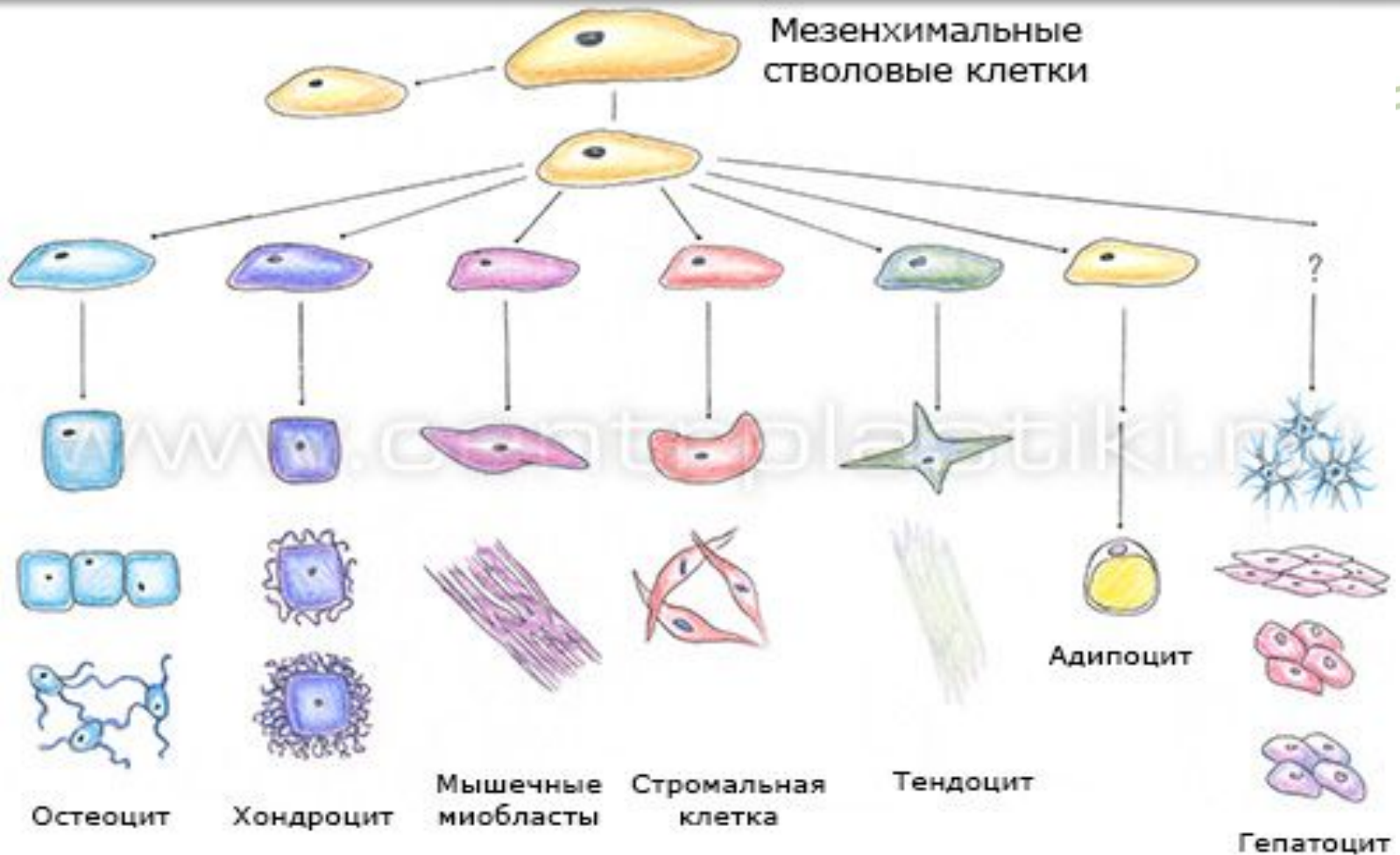


**Мультипотентные стволовые клетки, дающие начало клеткам крови:**

1. миелоидного ряда (моноциты, макрофаги, нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, эритроциты, мегакариоциты, тромбоциты, дендритные клетки)
2. лимфоидного ряда (Т-лф, В-лф и естественные киллеры)

# Мезенхимальные стромальные клетки

Мультипотентные стволовые клетки, способные дифференцироваться в остеобласты (клетки костной ткани), хондроциты (хрящевые клетки) и адипоциты (жировые клетки).



## Эмбриональные СК

## Взрослые СК костного мозга

**+**

- Неограниченная способность к росту
- Тотипотентность
- Минимальный фенотип

- Высокая пролиферативная активность
- Мульти- и плюрипотентность
- Легкость получения
- Отсутствие этических проблем
- Отсутствие необходимости иммуносупрессии (аутотрансплантация)

**—**

- Этические проблемы (статусэмбриона...)
- Трудно выделить чистую линию
- Риск отторжения
- Риск канцерогенеза
- Маркеры специфической дифференцировки плохо исследованы
- Дифференцировка *in vitro* плохо регулируется

- Маркеры специфической дифференцировки плохо исследованы
- Их количество резко уменьшается с возрастом
- Ограниченное использование при острой патологии и создания банков

# Лимит Хейфлика

в клетках существует механизм их старения (теломеры), который лимитирует количество клеточных делений (не более 50 - 60)



**2004 г. журнал Nature Genetics опубликовал результаты длительного культивирования 9 линий ЭСК из коллекции NIH (национальный институт здоровья, США)**

8 из 9 линий на поздних пассажах (55-59) несли генетические изменения характерные для злокачественных клеток:

- 45 % - генные мутации (делеции или амплификации) в области проонкогенов;
- 22 % - мутации митохондриальной ДНК;
- 90 % - увеличение метилирования генных промоторов (эпигенетические изменения).

**Вывод: терапевтическое клонирование ЭСК требует минимального числа пассажей in vitro.**

## Терапевтическое клонирование

## Перепрограммирование

Индукцированные стволовые клетки (иСК) – клетки, полученные из каких-либо иных (соматических, репродуктивных или плюрипотентных) клеток путем эпигенетического перепрограммирования.

Яйцеклетка

Соматическая клетка

Клетки кожи

Удаление ядра

Удаление ядра

Ядро из соматической клетки встраивается в яйцеклетку

Встраивание генов



Клонированные клетки делятся и развиваются в эмбрион



Перепрограммированные клетки становятся стволовыми



# Стволовые клетки. Перепрограммирование.



- слияние соматических клеток с плюрипотентными стволовыми клетками (**соматическая гибридизация**)
- модификация с помощью: генетического материала, кодирующего белковые репрограммирующие факторы (**генетическая инженерия**)



**SCNT** – пересадка ядер, взятых из соматических клеток, в оплодотворенную яйцеклетку, из которой предварительно удалено ядро

# Стволовые клетки. Перспективы.



## Клеточная трансплантология

**метод позволяет  
преодолеть:**

1. дефицит донорских органов
2. высокую стоимость трансплантации
3. опасность осложнений
4. проблемы этического характера

## Клеточная терапия

**метод позволяет  
осуществлять:**

1. тканевую и клеточную инженерию
2. косметологические процедуры
3. лечебные процедуры
4. заместительную терапию





*КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕРЕНИЯ. ЖИВОТНЫЕ. Лекция 9*

# **КЛОНИРОВАНИЕ ЖИВОТНЫХ**

# Формы клонирования



**ФОРМЫ**

**МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ**

**РЕПРОДУКТИВНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ**

**ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ КЛОНИРОВАНИЕ**

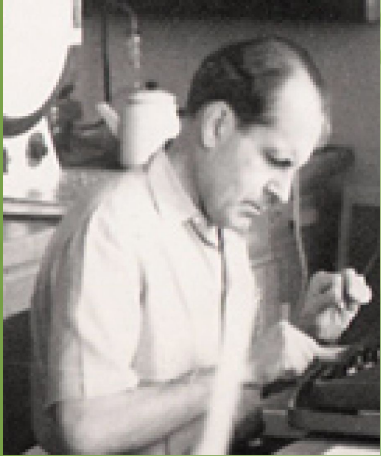
# Предыстория метода



**Ханс Шпеман**  
(1869-1941)

**1938 г.** – Х. Шпеман предложил эксперимент по переносу ядра

# ЭКСПЕРИМЕНТ Г.В. ЛОПАШЕВА



**1948 г.**

разработал метод трансплантации ядер в яйцеклетку лягушки

**Георгий Викторович  
Лопашов (1912-2010)**

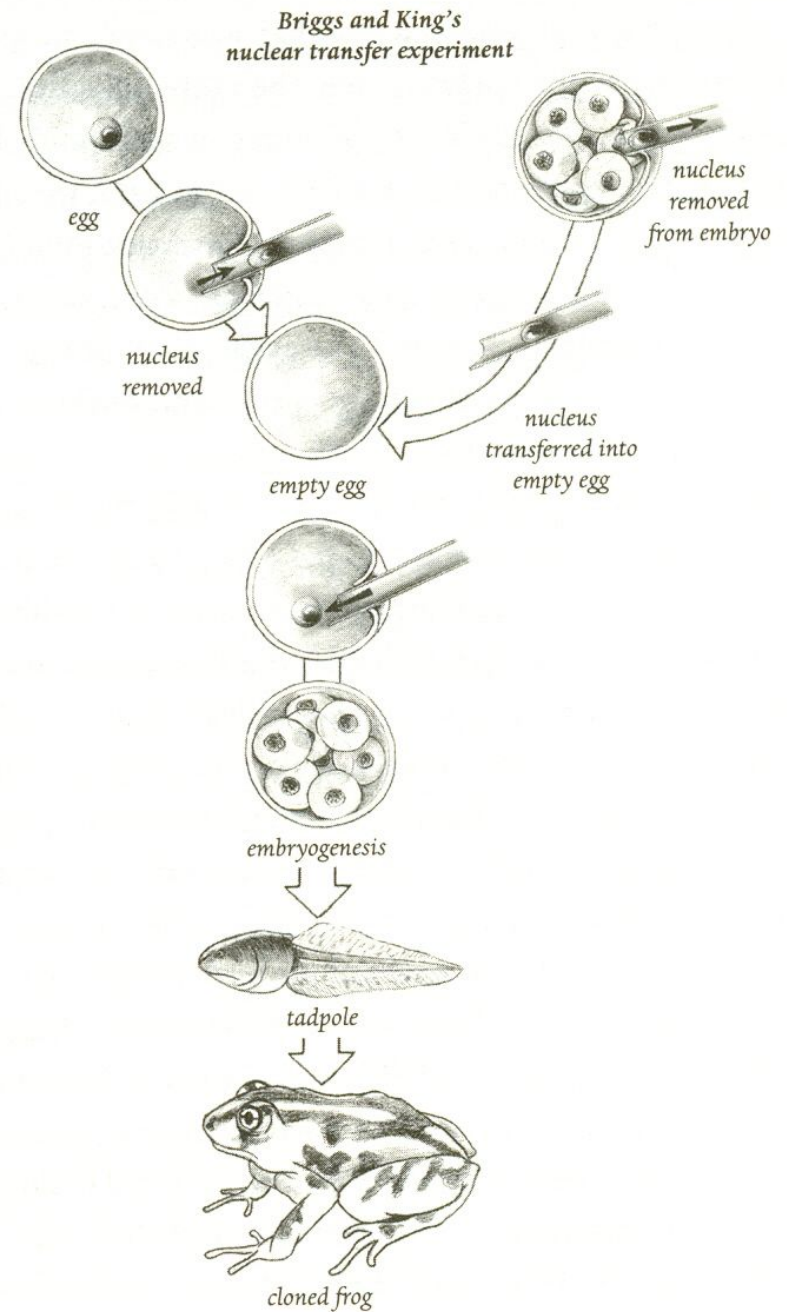


# ЭКСПЕРИМЕНТ Р. БРИГГСА И Т. КИНГА



**Роберт Бриггс и Томас Кинг**  
(1911-1983)      (1921-2000)

**1952 г.**  
повторили и усовершенствовали  
метод трансплантации ядер



# ЭКСПЕРИМЕНТ ДЖ. ГЕРДОНА



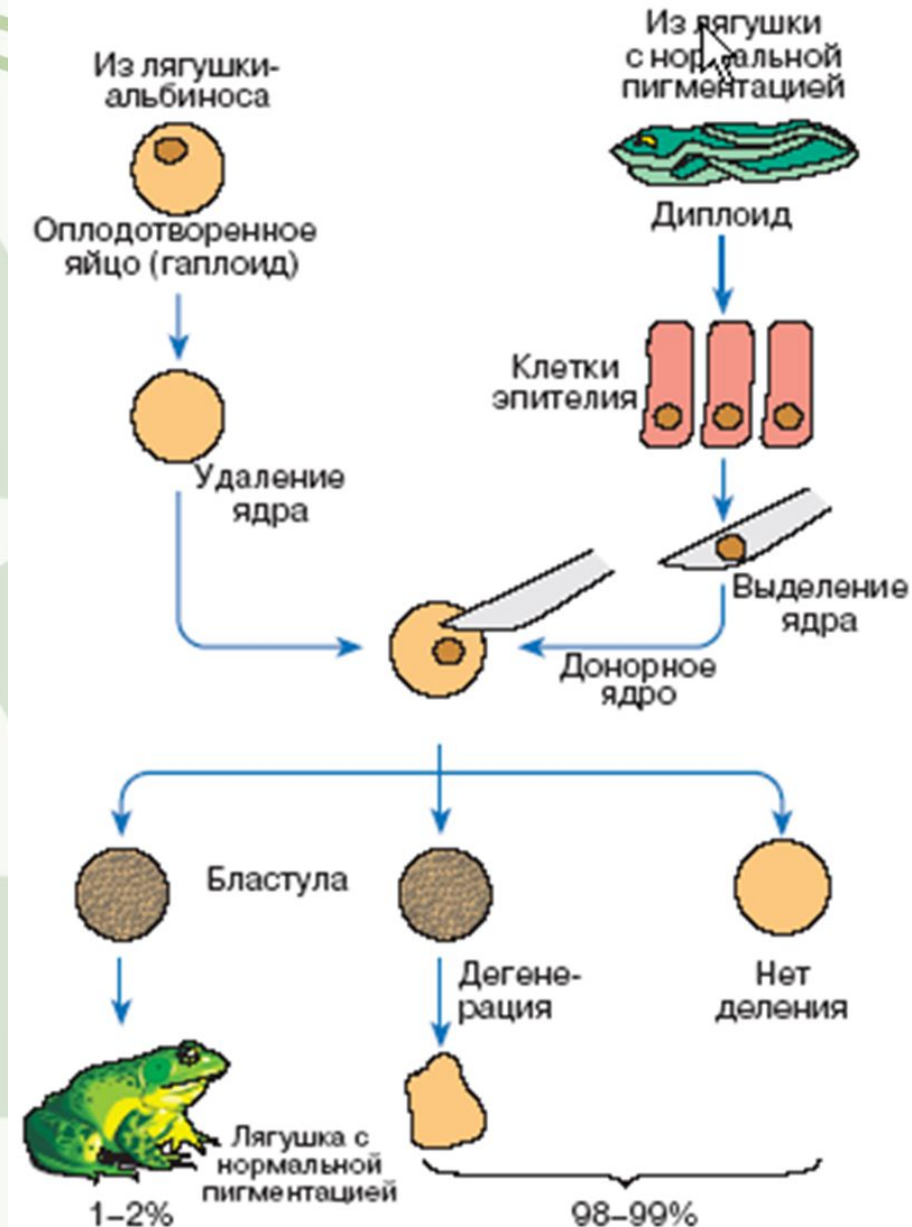
Джон Гёрдон  
(1933)

**1962 г.**

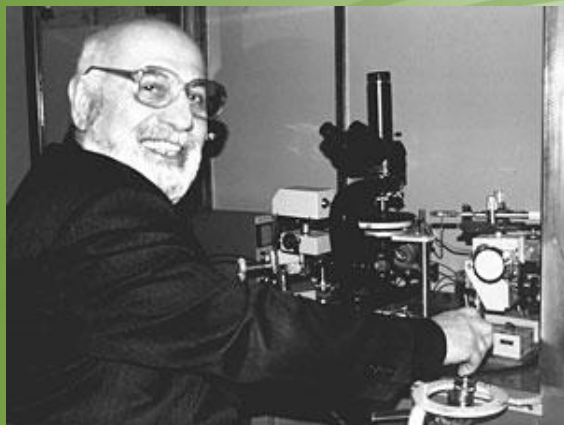
использовал в качестве донора ядер специализировавшиеся клетки эпителия кишечника головастика. Выживало не более двух процентов клонированного потомства.

**1970-е гг.**

разработал метод серийных пересадок

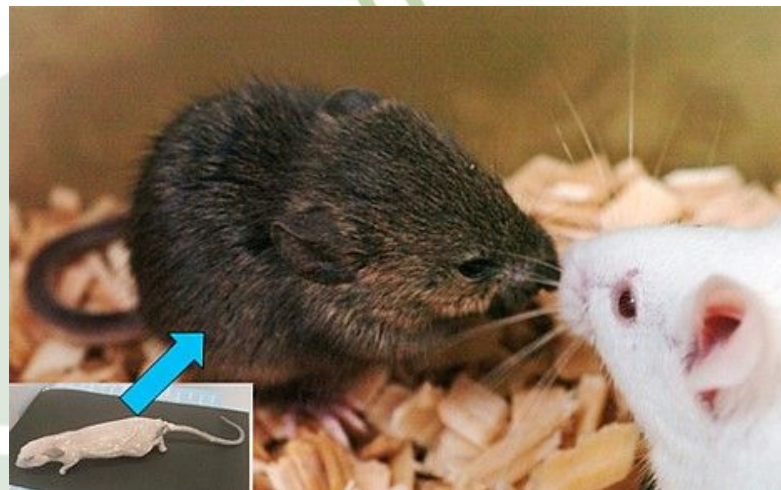


# ЭКСПЕРИМЕНТ Л.М. ЧАЙЛАХЯНА и сотр.



**1987 г.**  
первое клонирование млекопитающих  
(лабораторная линия мышей-альбиносов  
CBWA )

Чайлахян Л.М, Вепренцев Б.Н.,  
Свиридова Т.А., Никитин В.А.  
Электростимулируемое слияние клеток в  
клеточной инженерии //Биофизика, 1987



Мышку клонировали из невзрачной тушки,  
которая 16 лет провела в холодильнике



# ЭКСПЕРИМЕНТ Я. УИЛМУТА



**Ян Уилмут**      **Долли**  
(1944)              (1996-2003)



**Билл Ритчи**



**Карен Майкок**



Долли со своим  
первым ягненком Болли

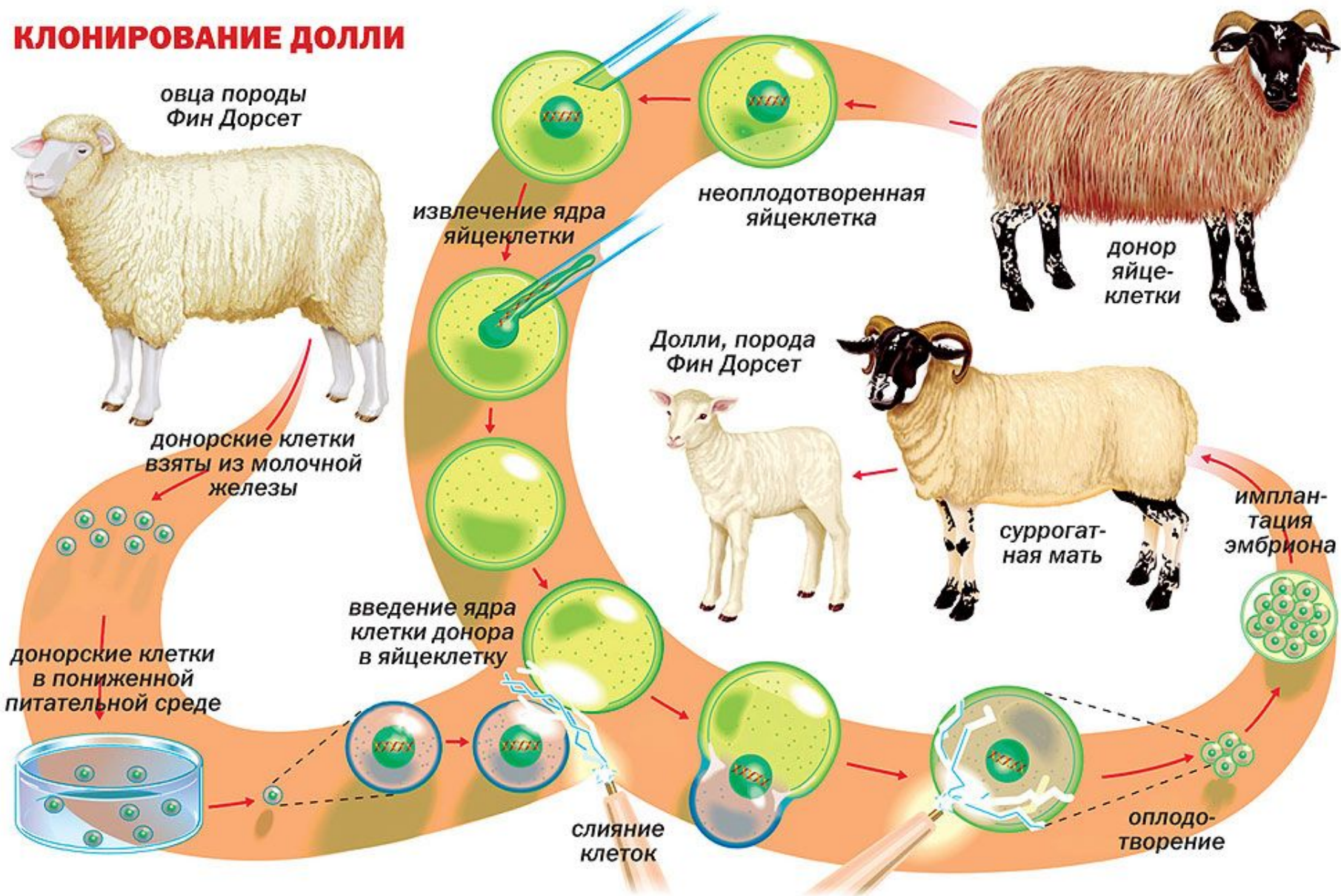


клонирование осуществлялось при  
помощи технологии ядерного переноса





# КЛОНИРОВАНИЕ ДОЛЛИ



# **КЛОНИРОВАНИЕ. ТРАНСНУКЛЕОГЕНЕЗ. Определение термина.**



**перенос ядра из дифференцированной клетки в неоплодотворённую яйцеклетку в энуклеированную яйцеклетку с последующей пересадкой реконструированной зиготы в яйцевод сурогатной матери**

# ТЕХНИКА КЛОНИРОВАНИЯ



**I этап** Получение ядра для трансплантации



**II этап** Получение энуклеированной клетки-реципиента



**III этап** Получение реконструированной зиготы



**IV этап** Клонирование



## **ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ**

### **МЕХАНИЧЕСКИЕ**

*(использование микропипеток)*

### **ХИМИЧЕСКИЕ**

*(использование химических веществ, например цитохалазина В)*

### **ФИЗИЧЕСКИЕ**

*(переменное электрическое поле, УФ-излучение, лазер)*

# 1 Этап. Получение ядра для трансплантации



Донорская клетка отбирается у клонируемого животного и из нее при помощи микропипетки забирается ядро



# 2 Этап. Получение энуклеированной яйцеклетки

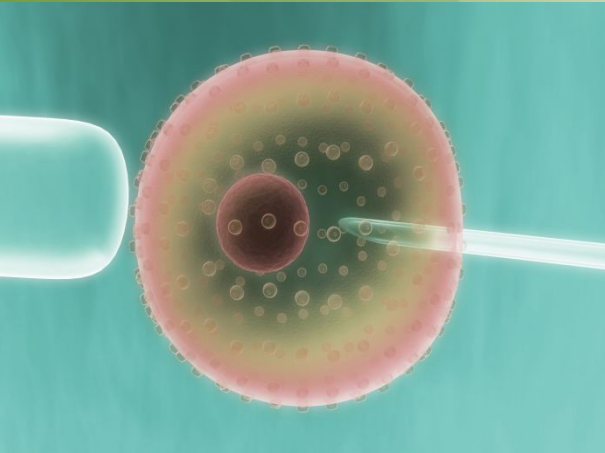


Реципиентная клетка (неоплодотворенная яйцеклетка) отобранная у животного непосредственно после овуляции подвергается энуклеации (удаление ядра)

МЕТОДЫ

Микро-манипуляция

Действие УФ



# 3 Этап. Реконструирование ЗИГОТЫ



ядро с хромосомной ДНК клетки-донора соединяется с лишенной генетического материала яйцеклеткой (слияние)



# МЕТОДЫ СЛИЯНИЯ. МИКРОМАНИПУЛЯЦИЯ



1. тонкой микропипеткой прокалывают зоны пеллюцида и плазматической мембраны и извлекают пронуклеусы
2. пипеткой, большего диаметра (12 мкм) в то же отверстие вводят диплоидное ядро донора.

*В этом случае меньше травмируется цитоплазма зиготы и транспортируемое ядро донора*

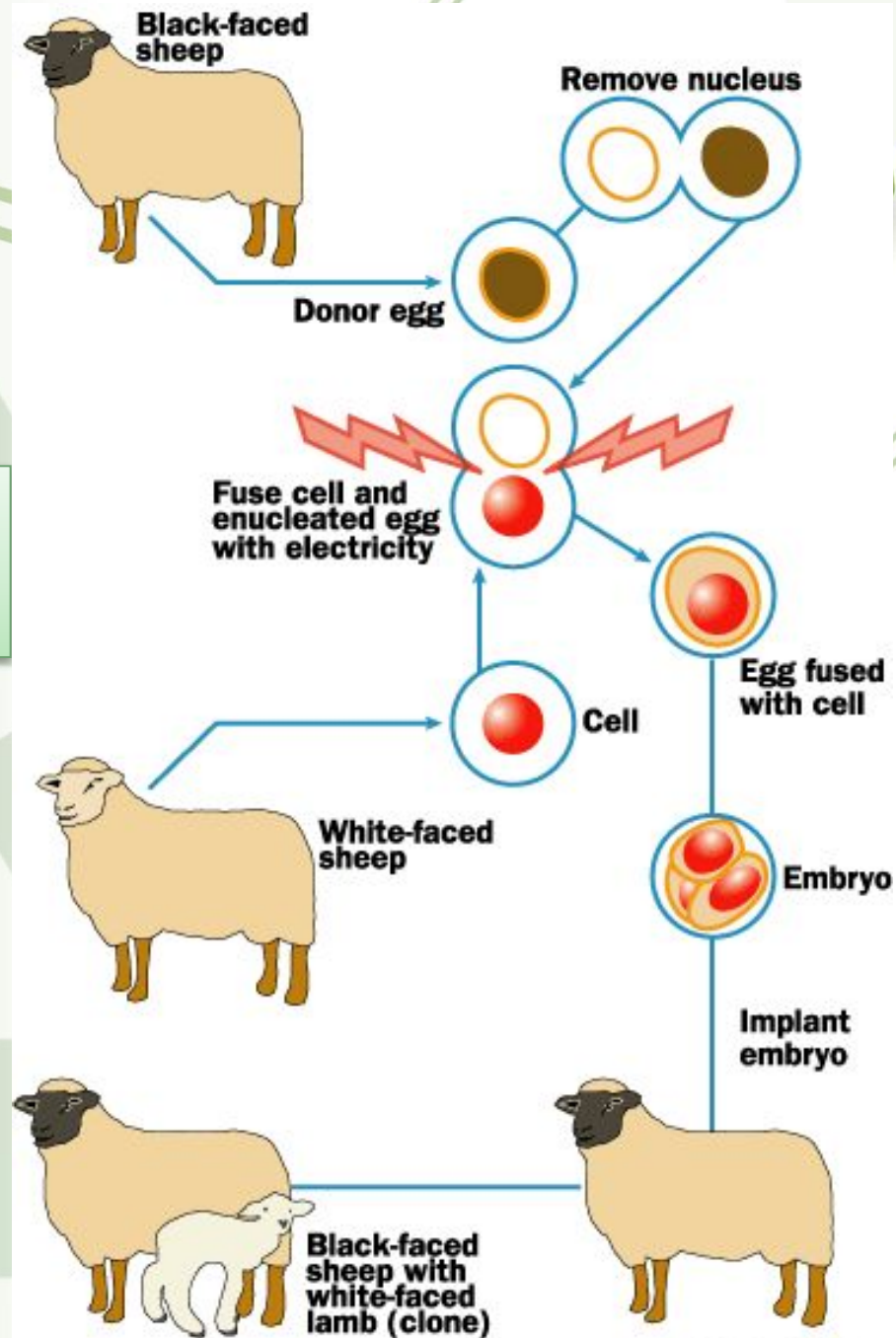


Зона пеллюцида – наружная белковая оболочка яйцеклетки



# МЕТОДЫ СЛИЯНИЯ. ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИЯ

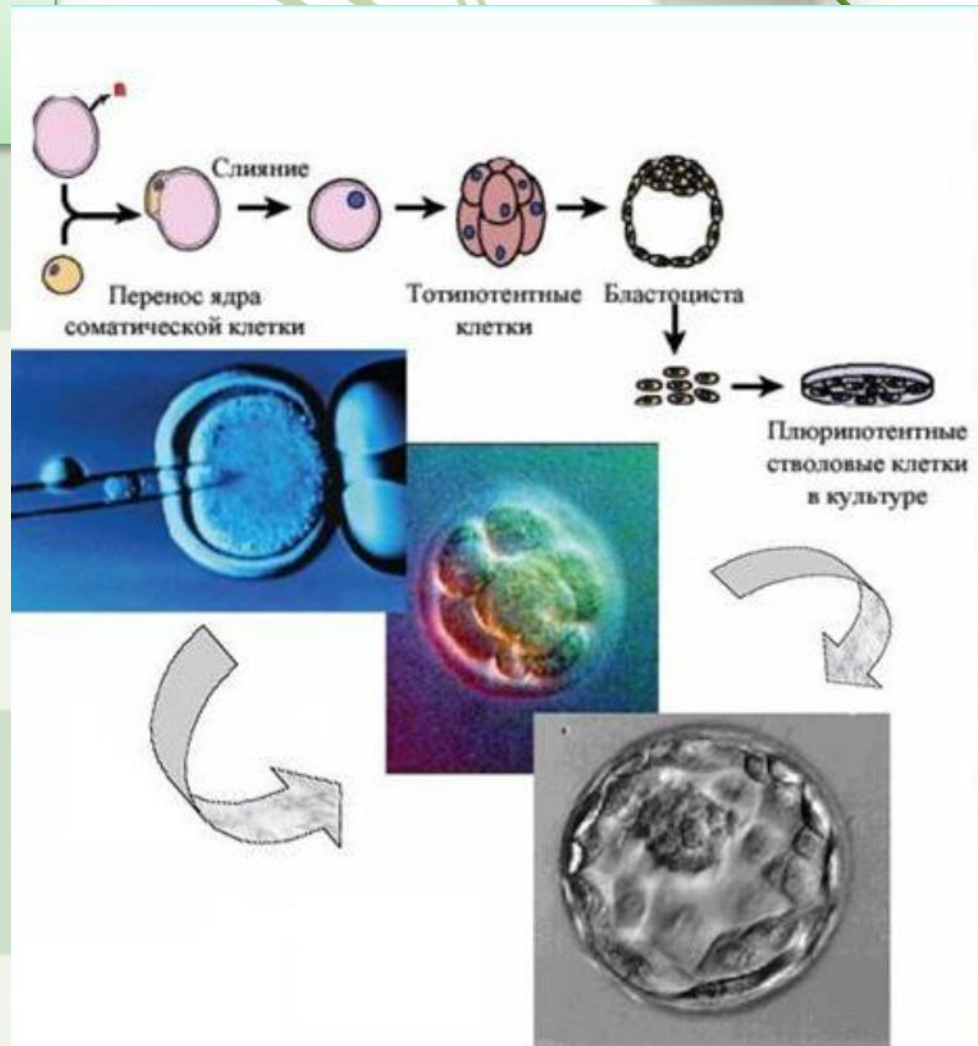
1. первый разряд – для слияния клеток
2. второй – для стимуляции механизма дробления



# 4 Этап. Процедура ЭКО или терапевтическое клонирование



Культивирование *in vitro* – реконструированный зародыш вступает в стадию дробления

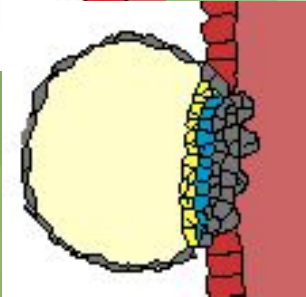


# 4 Этап. Процедура ЭКО или терапевтическое клонирование

Предимплантационный зародыш помещают в матку суррогатной матери, либо развитие эмбриона останавливают



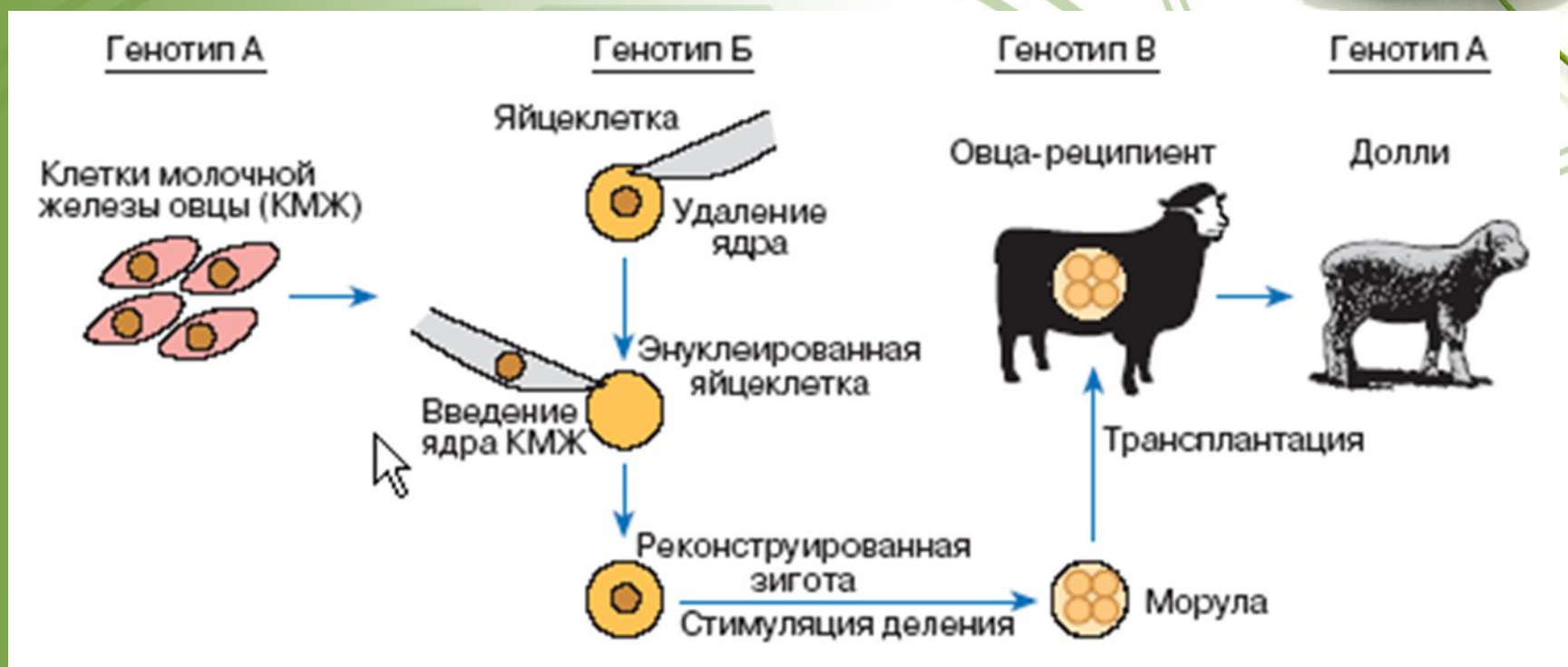
Бластоциста приближается к стенке матки



Бластоциста начинает внедряться (имплантироваться) под слизистую оболочку



Имплантация практически закончена



# клонирование



## репродуктивное

**создание точной копии организма с использованием его генетического материала**

*(клонирование исчезающих или вымерших видов; решение проблемы первичного бесплодия: коммерческое клонирование домашних животных и пр.)*

## терапевтическое

**метод получения клеточных культур-трансплантатов**

*(решение проблем трансплантологии; генная терапия; научные исследования в области молекулярно биологии и пр.)*

# Основные современные подходы при клонировании животных



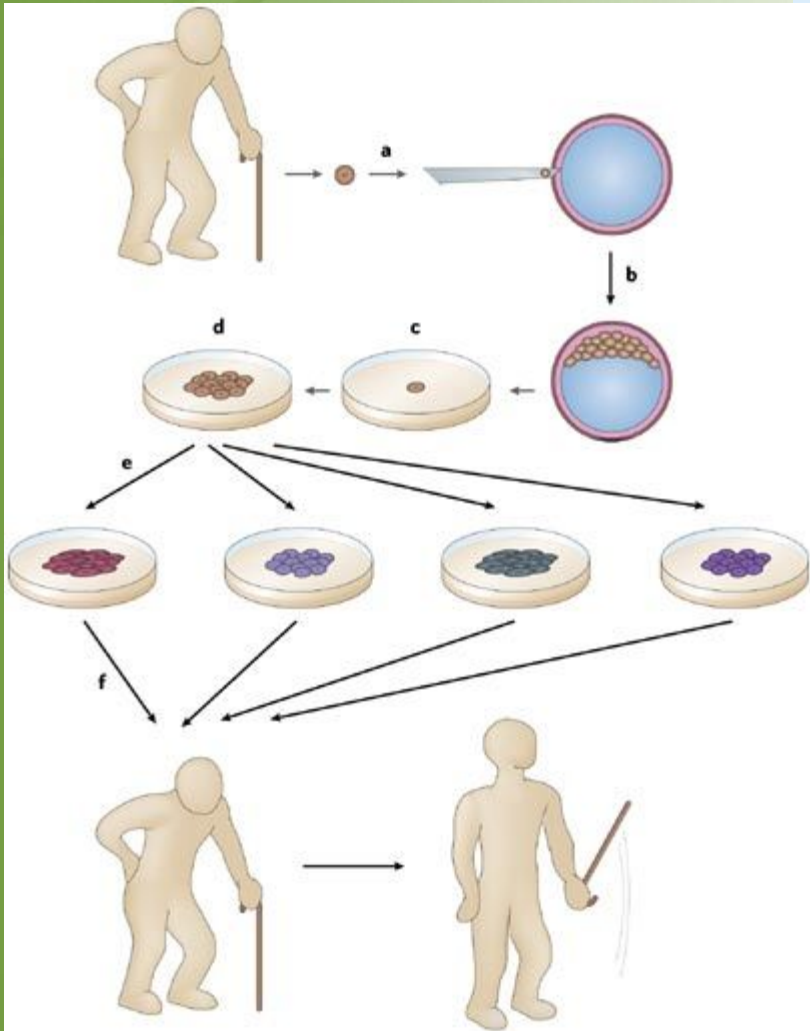
- **Фрагментирование предимплантационного эмбриона со стимуляцией последующего развития** (*таким путем были получены особи разных видов млекопитающих – мышей, коров, овец, лошадей*)
- **Пересадка ядер предимплантационных эмбрионов в энуклеированные клетки** (*клонирование земноводных – шпорцевой лягушки и пр.*)
- **Пересадка ядер соматических клеток взрослой особи в энуклеированные клетки** (*овечка Долли*)

# ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ КЛОНИРОВАНИЕ

получения клеточных культур – трансплантатов



1. Оплодотворенная яйцеклетка (зигота)
2. Зигота делится надвое
- 3-4. Митотическое деление продолжается
5. Через 5-6 дней образуется бластоциста
6. Внутреннюю часть бластоцисты (ВКМ) помещают на питательную среду для получения стволовых клеток
7. Воздействуя химическими веществами индуцируют дифференцировку СК в клетки разного типа (например, миоциты)
8. Предшественников миоцитов используют для клеточной терапии



# Human Therapeutic Cloning

