

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

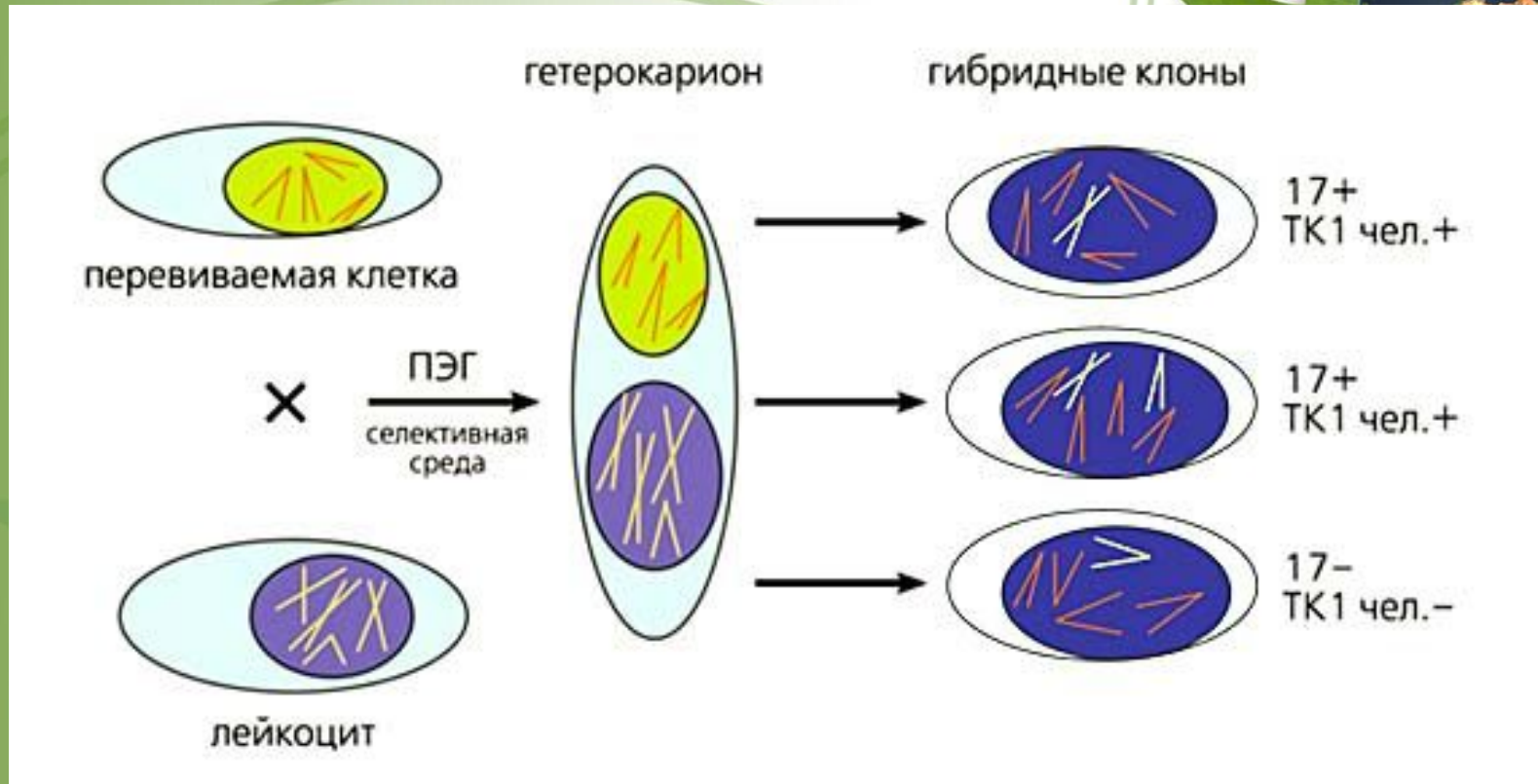




КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕРЕНИЯ. ЖИВОТНЫЕ. Лекция 9

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

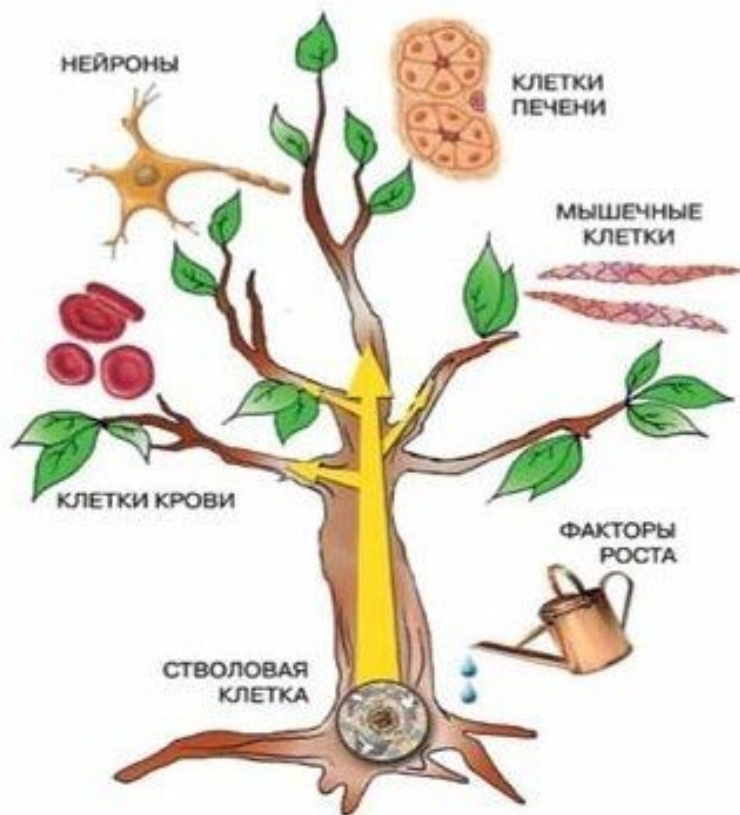


КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕРЕНИЯ. ЖИВОТНЫЕ. Лекция 9

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 (гемопозитические) стволовые
клетки в костном мозге**

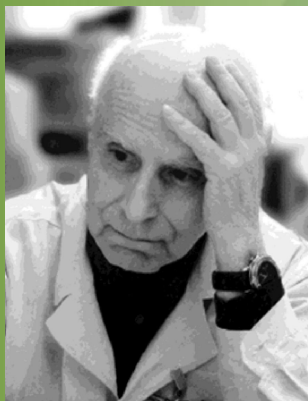


Drs. James Till and Ernest McCulloch

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)



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

Иосиф Львович
Чертков



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

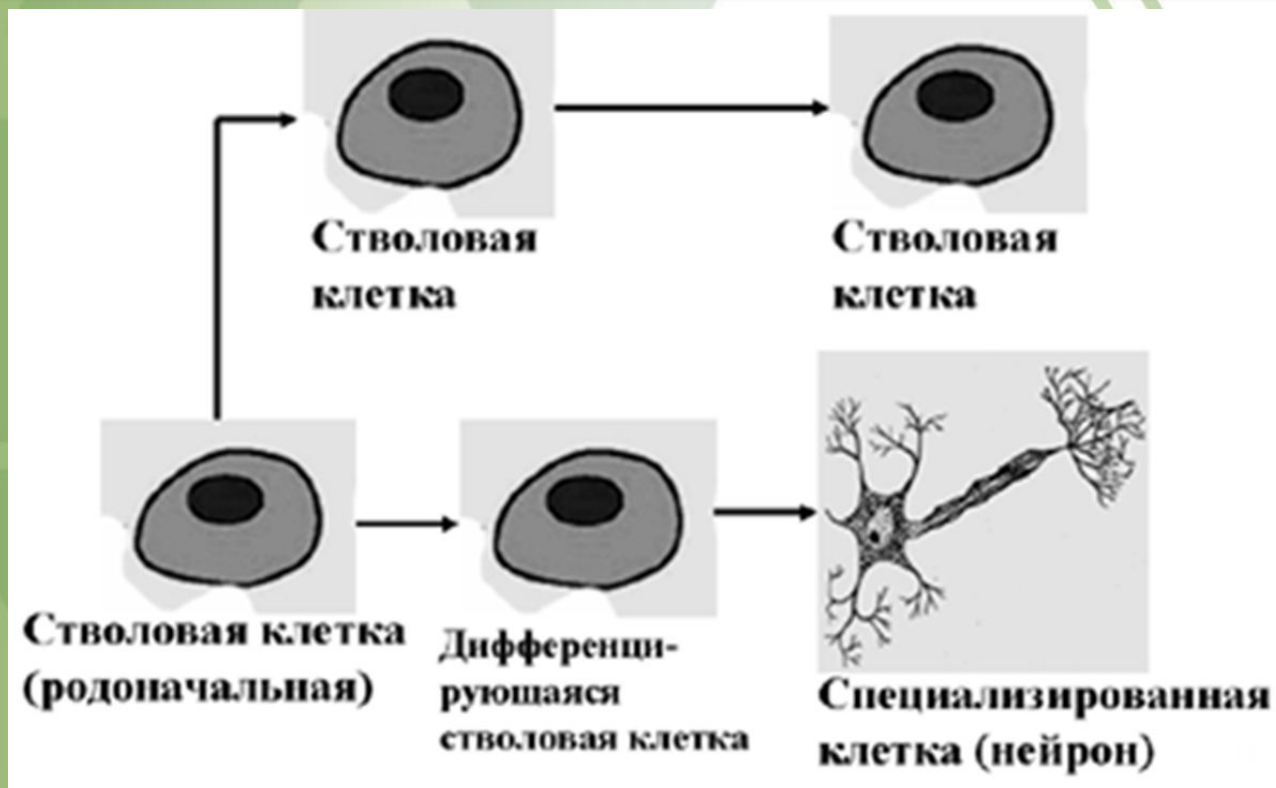
По утверждению журнала Science выделение и размножение в питательной среде эмбриональных стволовых клеток является третьим по значимости открытием в биологии (после расшифровки двойной спирали ДНК и завершения научной программы «Геном человека»).

Стволовые клетки.

Определение термина.



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



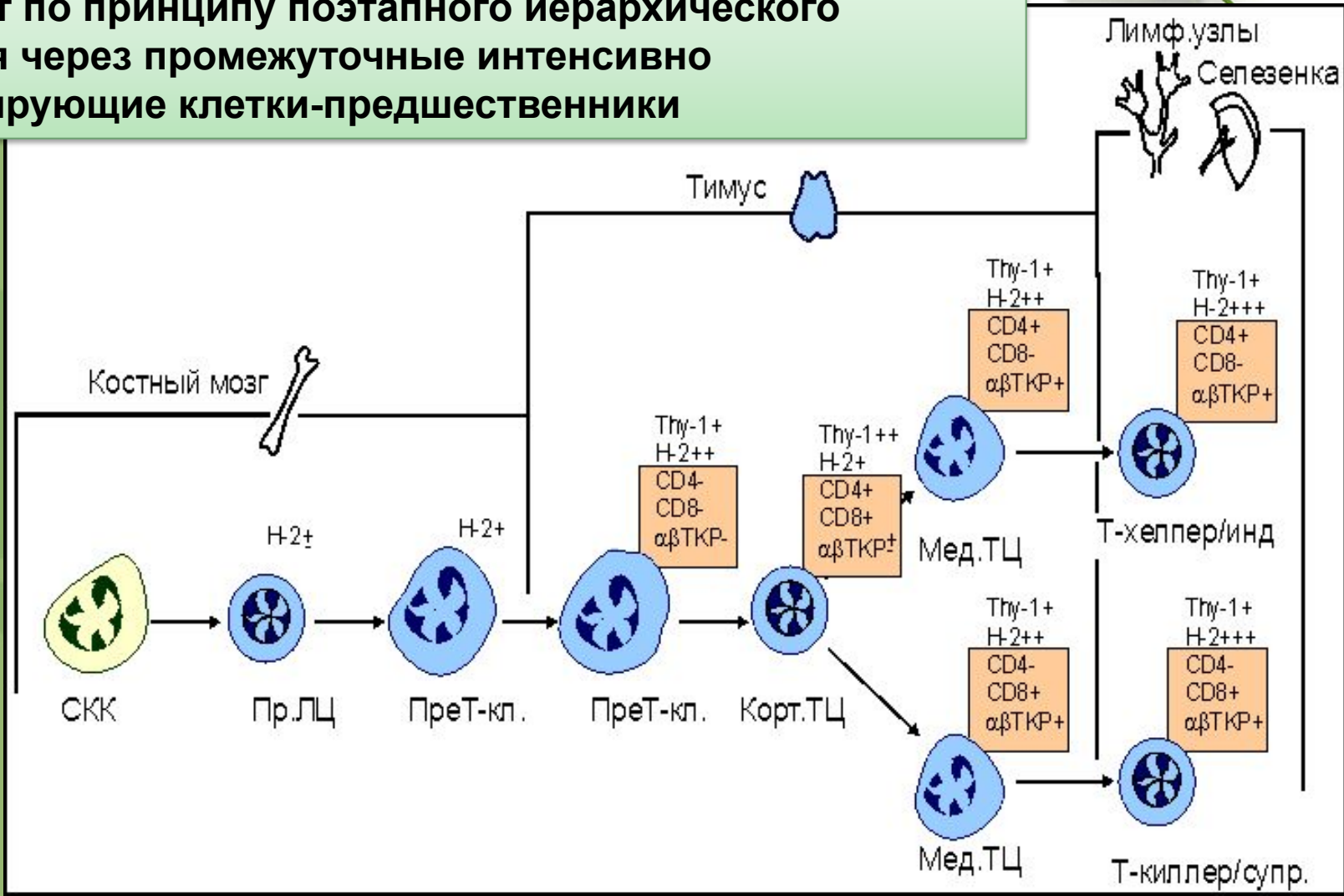
Стволовые клетки. Свойства.



- 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

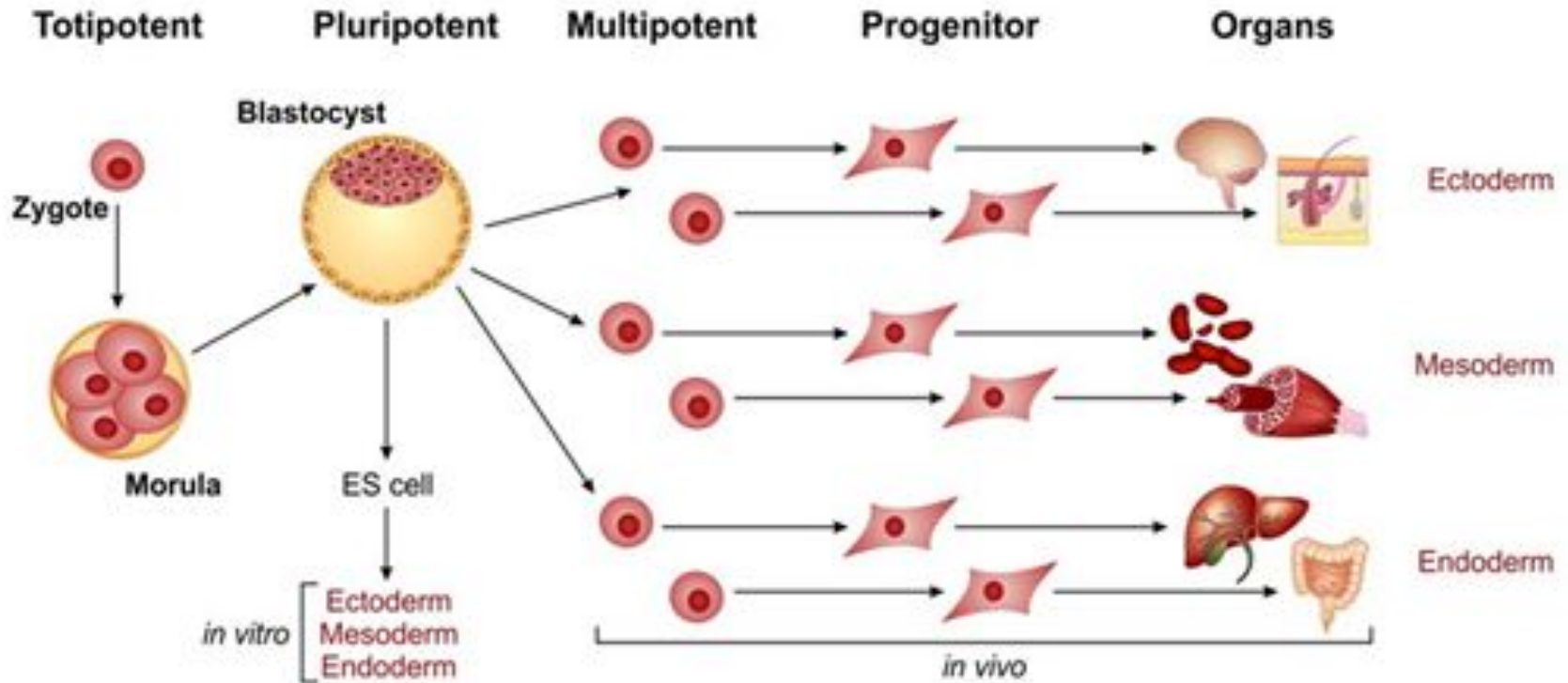
Плюрипотентные – клетки способные дифференцироваться во все типы клеток, кроме клеток внезародышевых органов (плаценты и желточного мешка)

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.

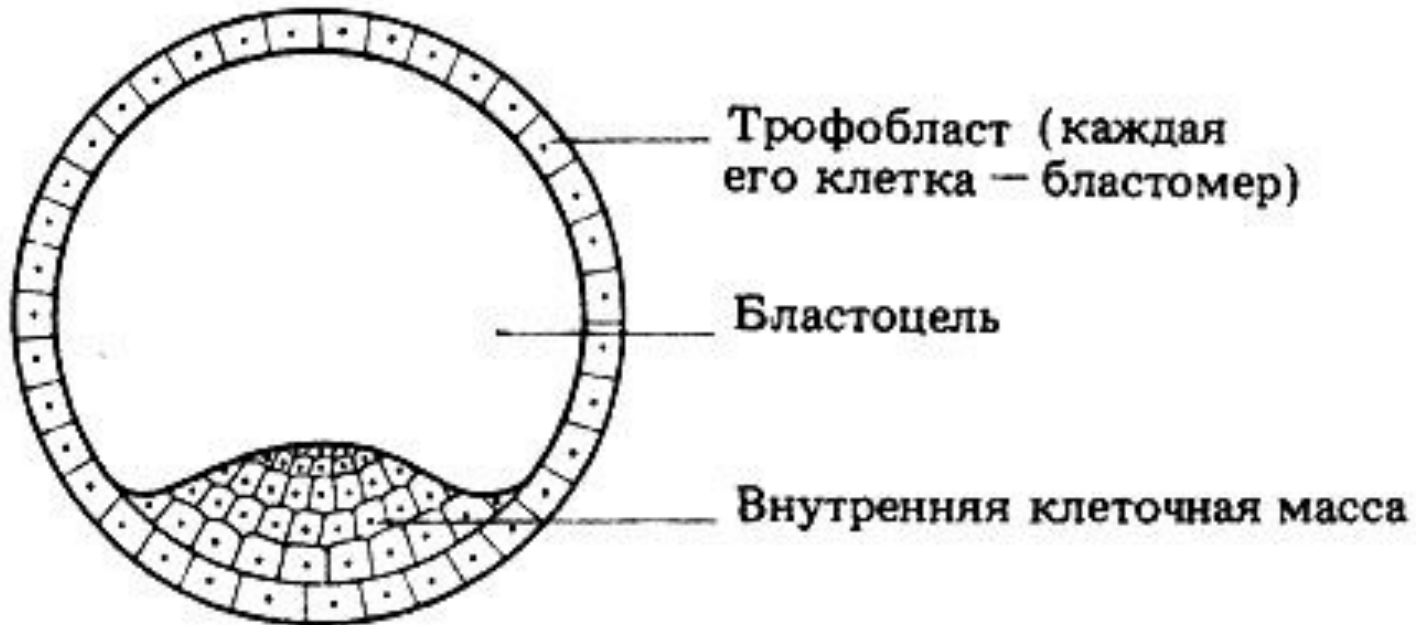
- **Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК)**
- **Фетальные стволовые клетки**
- **Стволовые клетки взрослого организма**
 - а.) **Гемопозитические стволовые клетки (ГСК)**
 - б.) **Мультипотентные мезонхимальные стромальные клетки (ММСК)**
 - г.) **Тканеспецифичные стволовые клетки**



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)

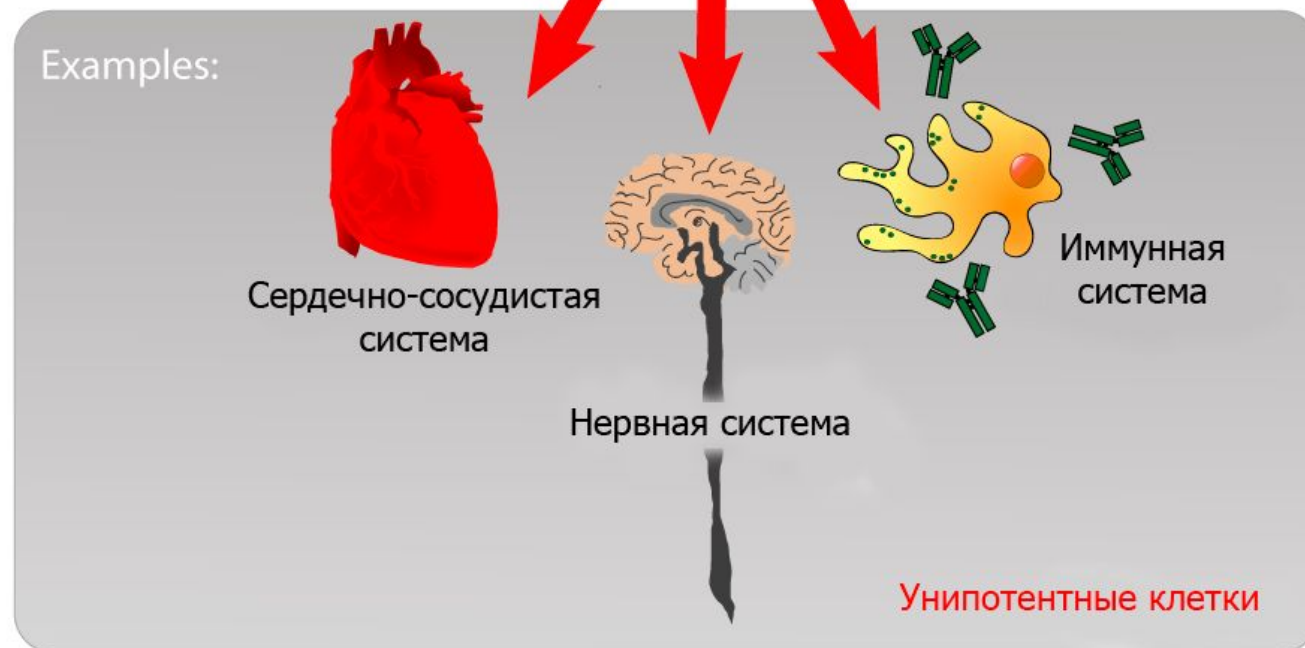
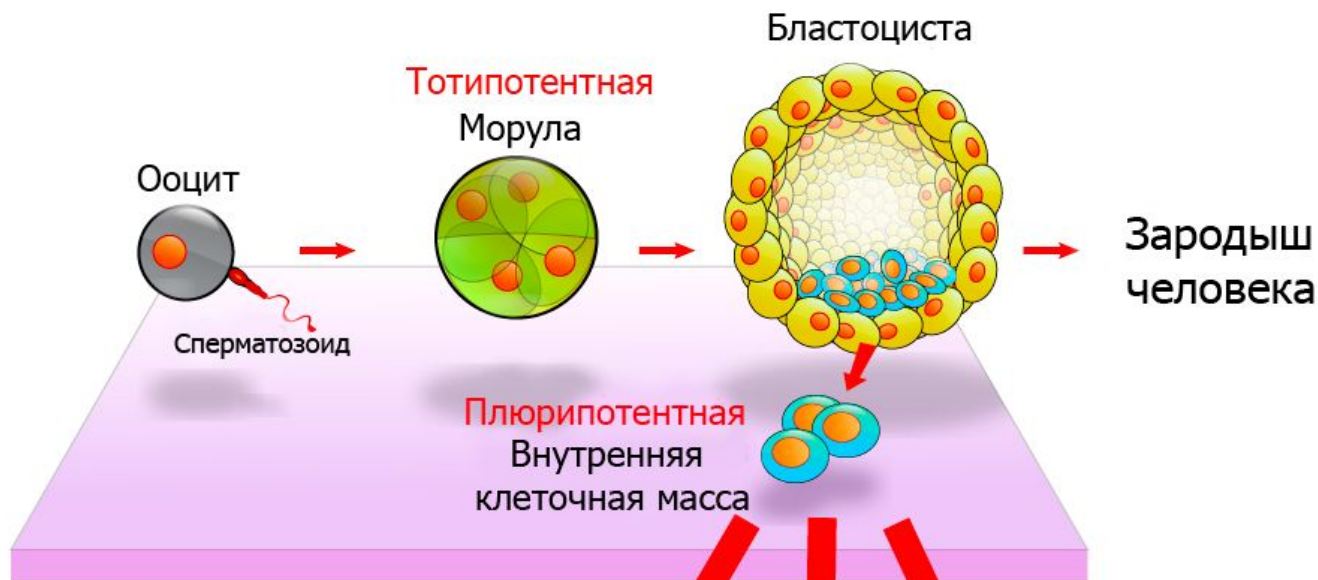
Характеристика:

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



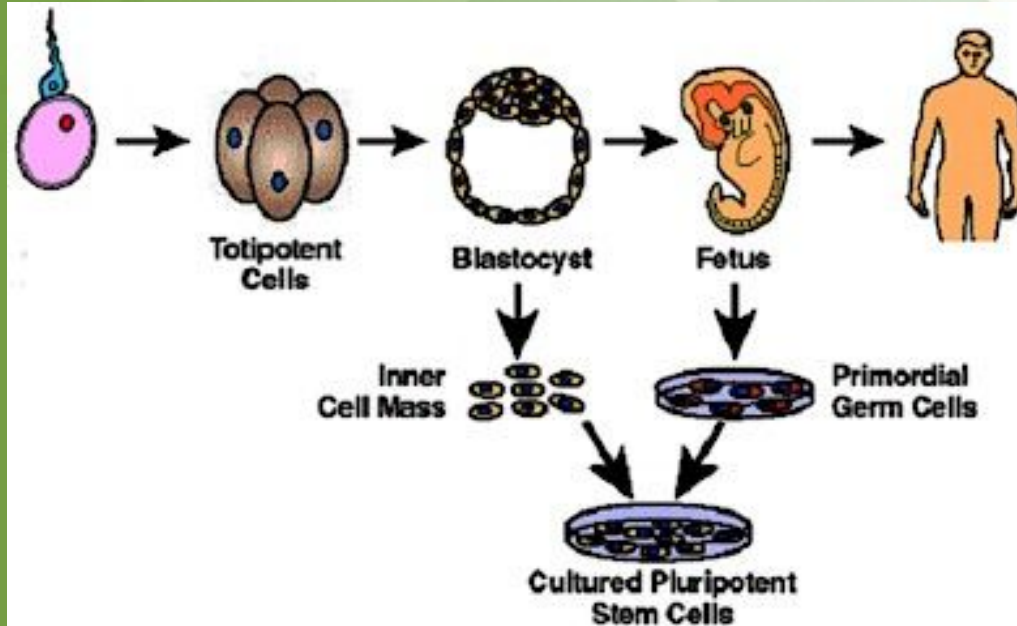
Получение:

- 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.

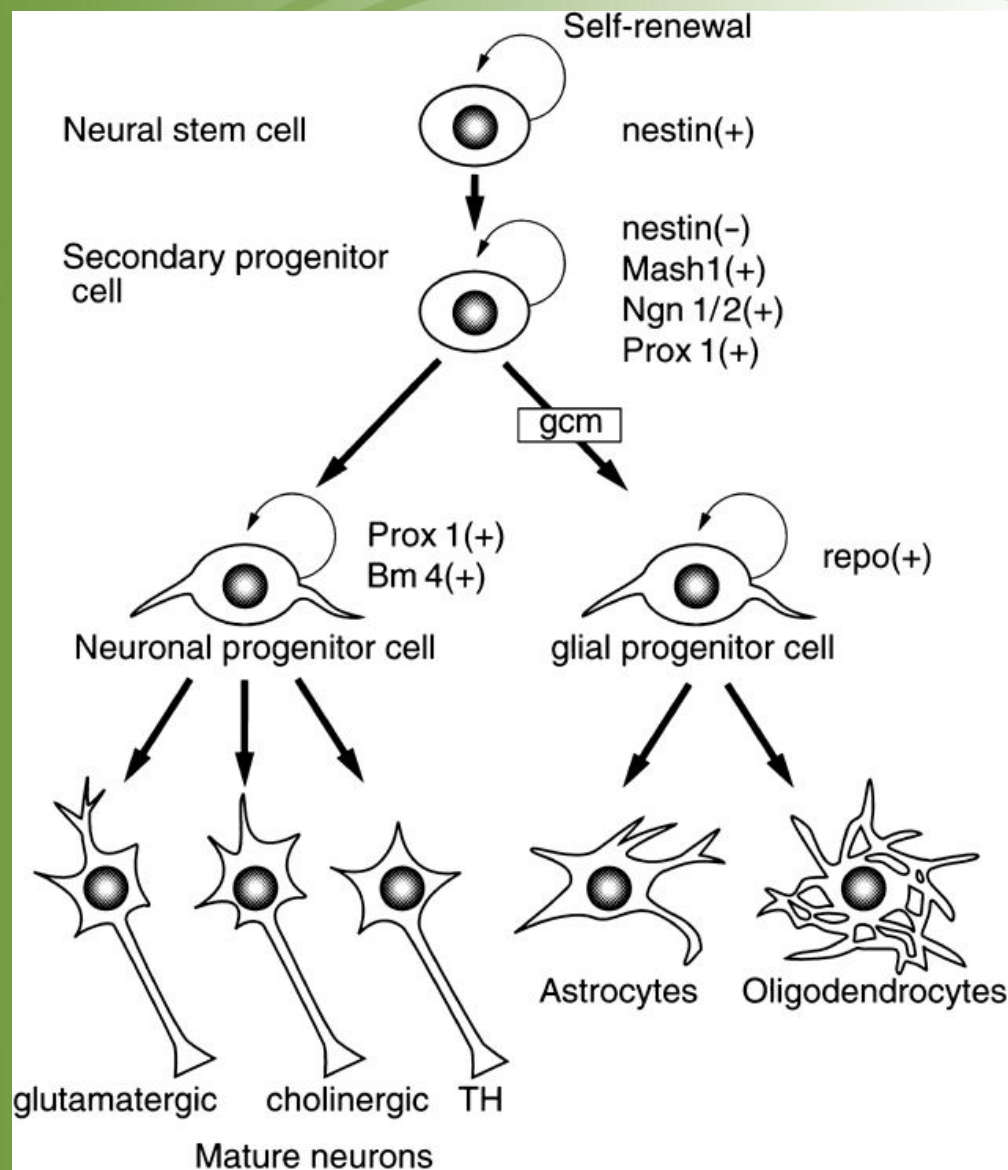
Стволовые клетки взрослого организма





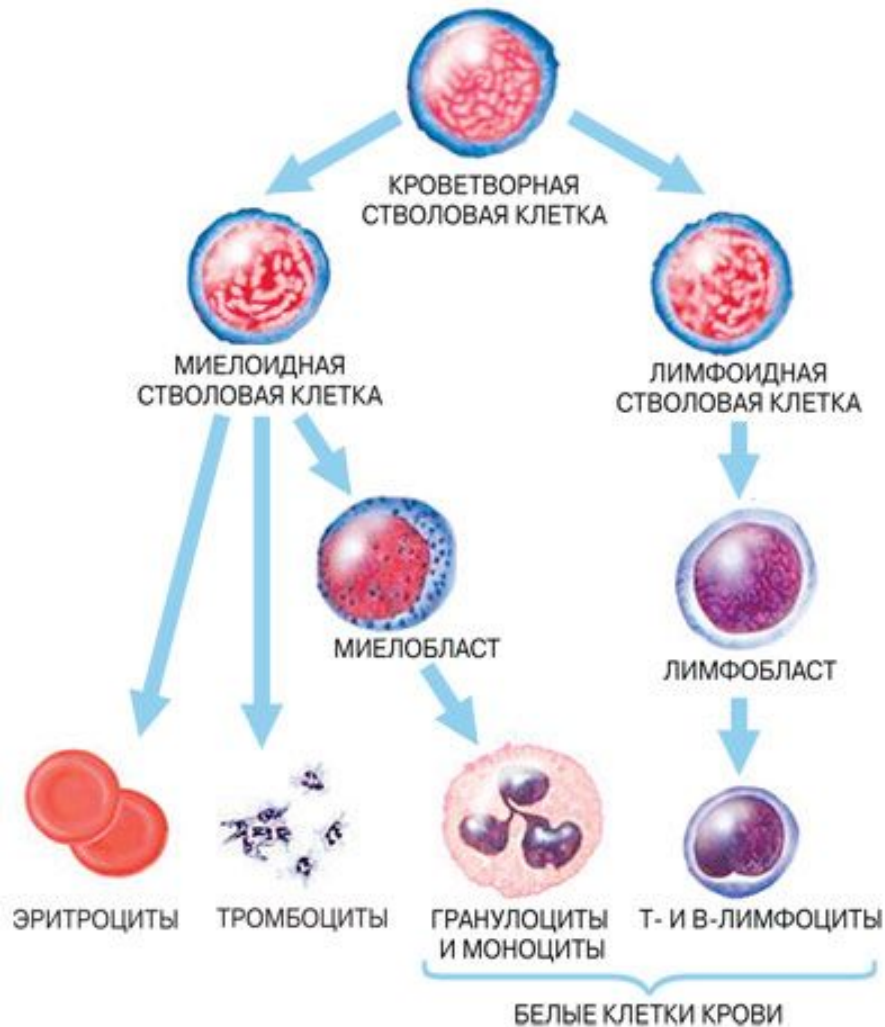
Тип стволовых клеток	Локализация	Путь дифференцировки
Мезенхимальные	Костный мозг, жировая ткань	Кардиомиоциты, миоциты, гладкомышечные клетки, астроглия, костная, хрящевая, стромальная ткани, нервные клетки, эндотелий?
Кроветворные	Костный мозг, селезенка (грызуны)	Эритроциты, гранулоциты, моноциты-макрофаги,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



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

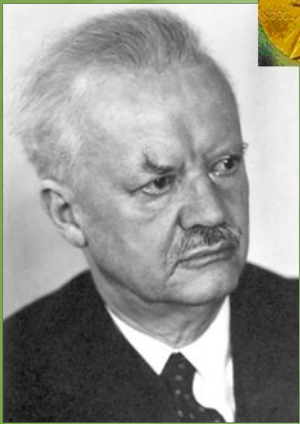
КЛОНИРОВАНИЕ ЖИВОТНЫХ

Формы клонирования



- **ФОРМЫ**
- **МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ**
- **РЕПРОДУКТИВНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ**
- **ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ КЛОНИРОВАНИЕ**

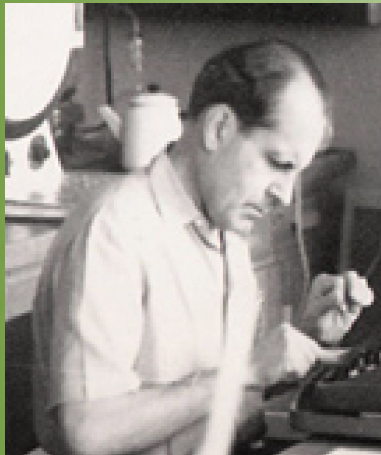
Предыстория метода



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)**



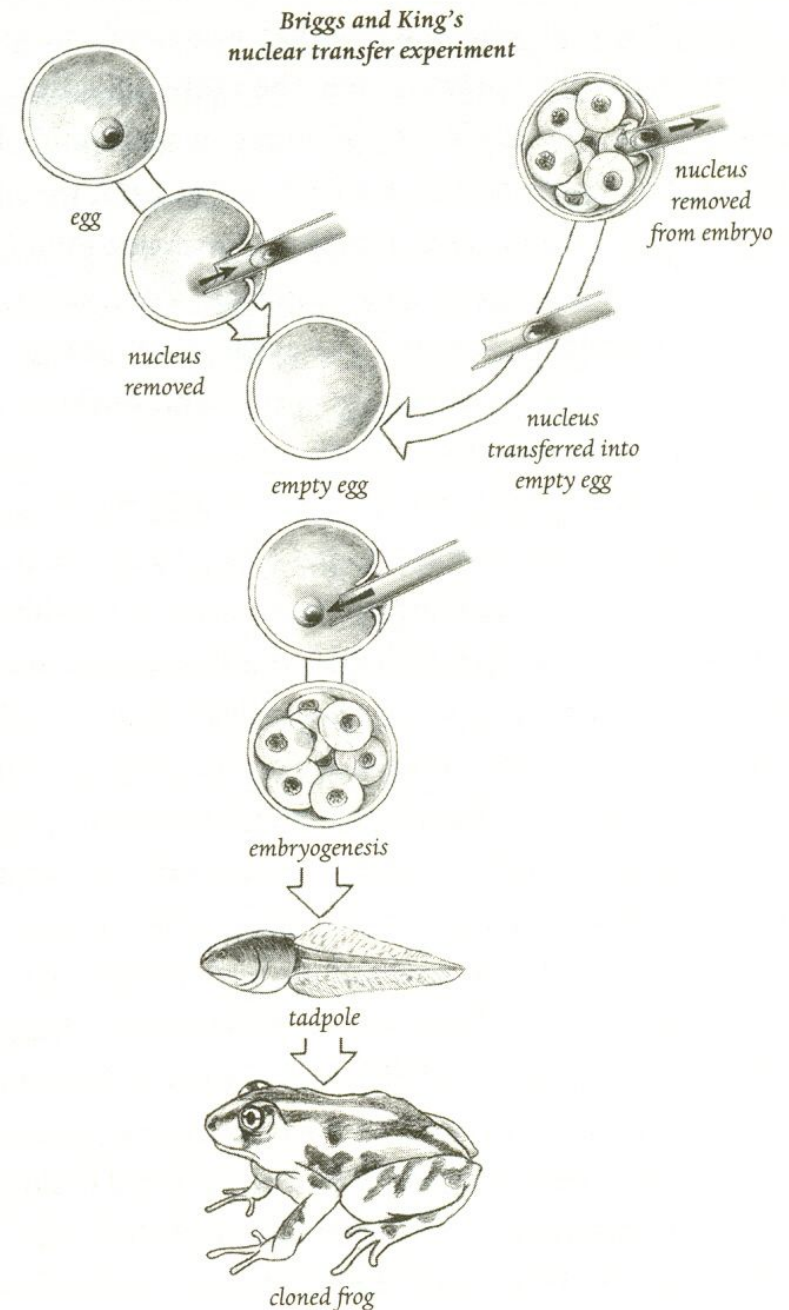
ЭКСПЕРИМЕНТ Р. БРИГГСА и Т. КИНГА



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

1952 г.

повторили и усовершенствовали
метод трансплантации ядер



ЭКСПЕРИМЕНТ ДЖ. ГЕРДОНА



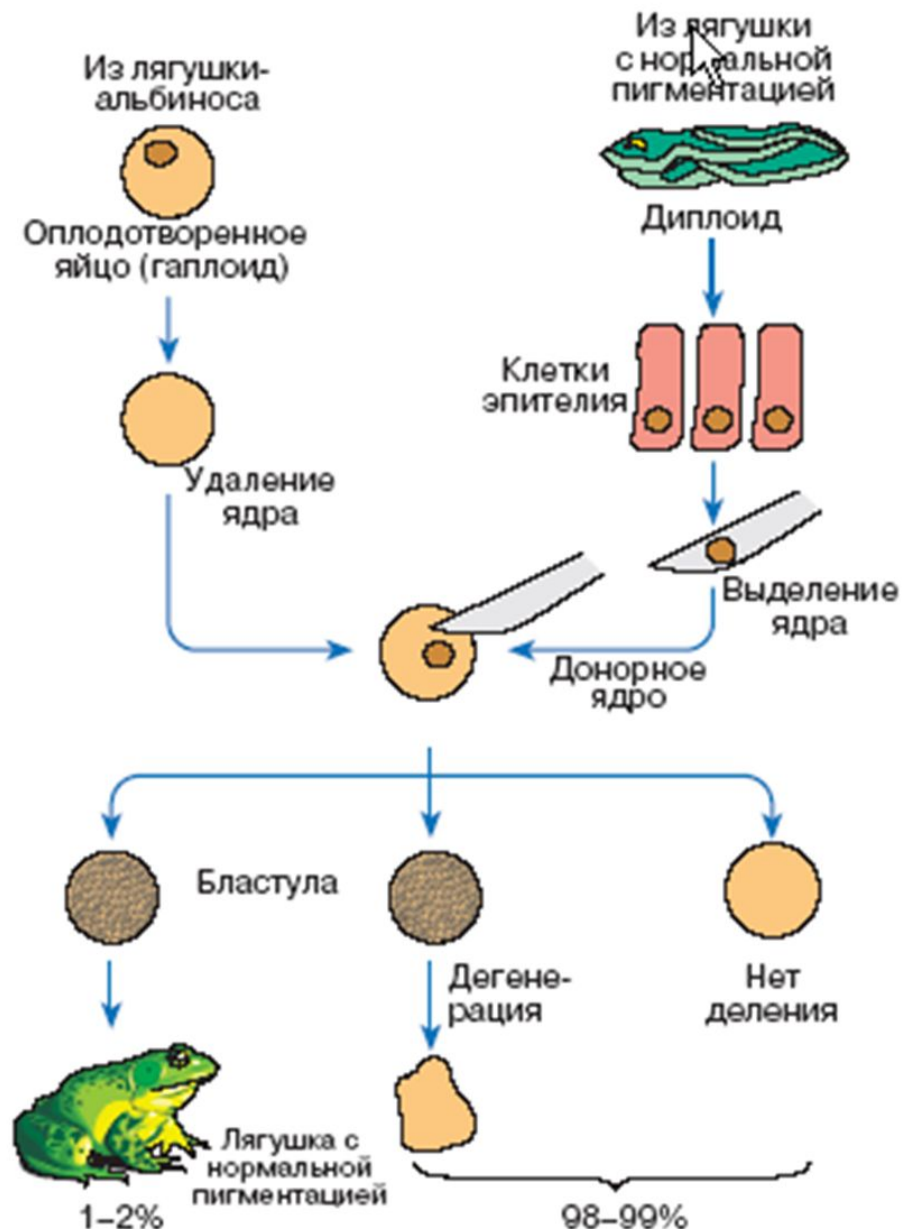
Джон Гёрдон
(1933)

1962 г.

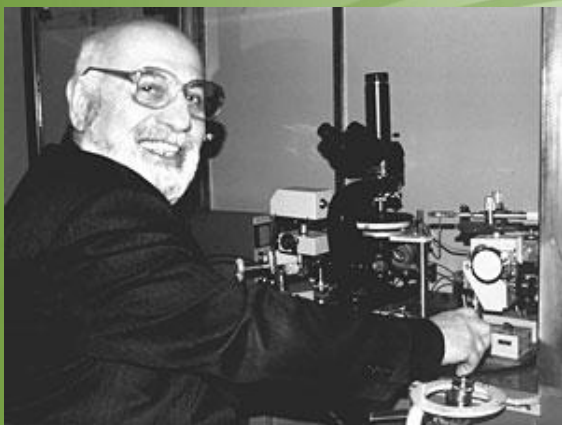
использовал в качестве донора ядер специализировавшиеся клетки эпителия кишечника головастика. Выживало не более двух процентов клонированного потомства.

1970-е гг.

разработал метод серийных пересадок



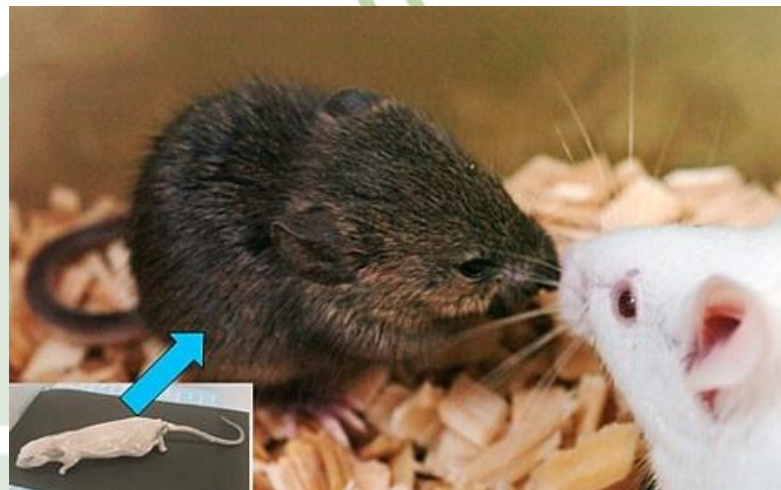
ЭКСПЕРИМЕНТ Л.М. ЧАЙЛАХЯНА и сотр.



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
(1944)



Долли
(1996-2003)



Билл Ритчи



Карен Майкок



Кейт Кэмпбэлл
(1954-2012)

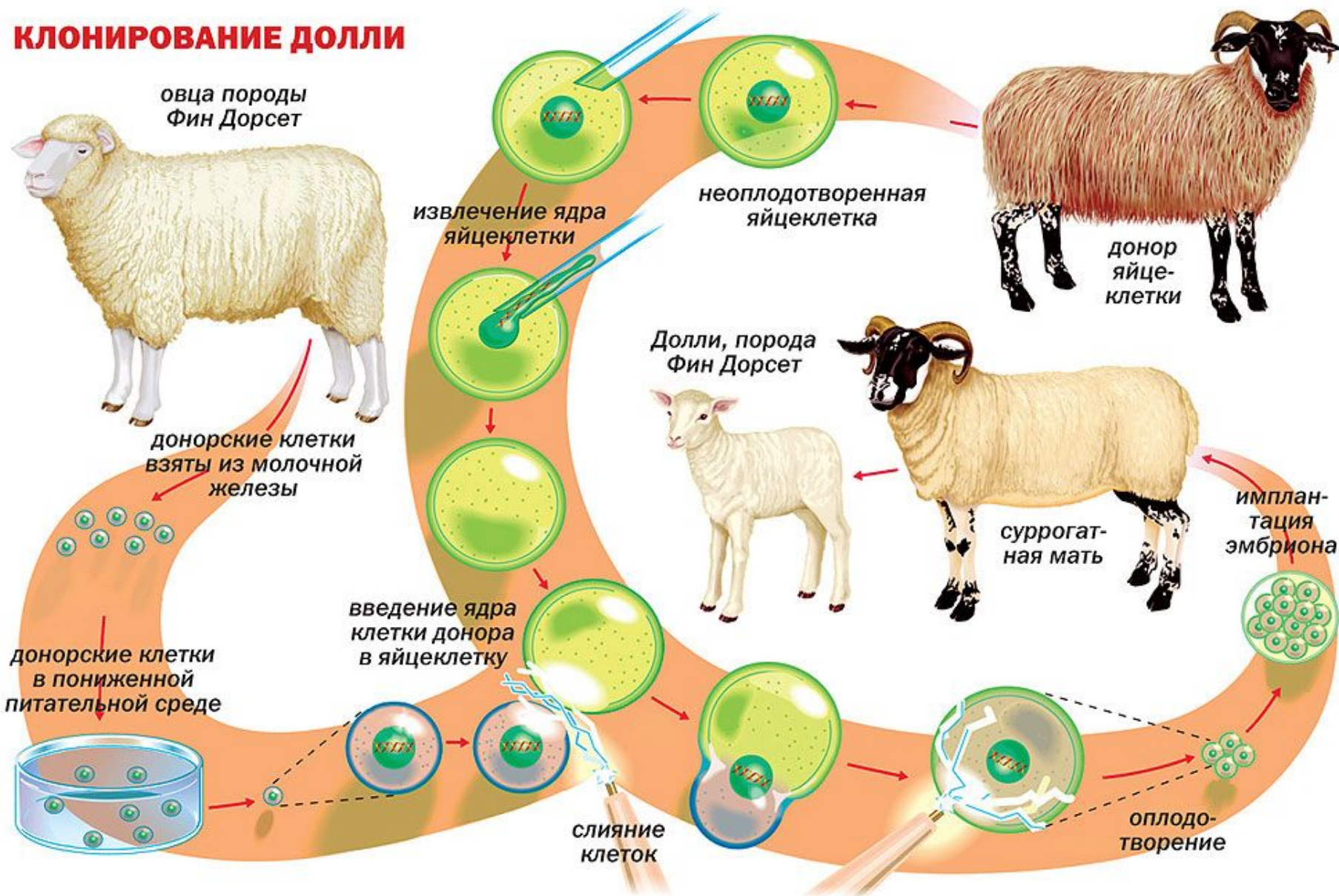


Долли со своим
первым ягненком Болли



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



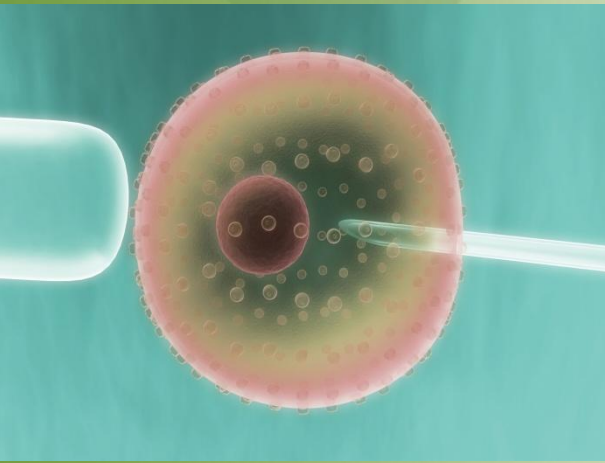
Донорская клетка отбирается у клонируемого животного и из нее при помощи микропипетки забирается ядро



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

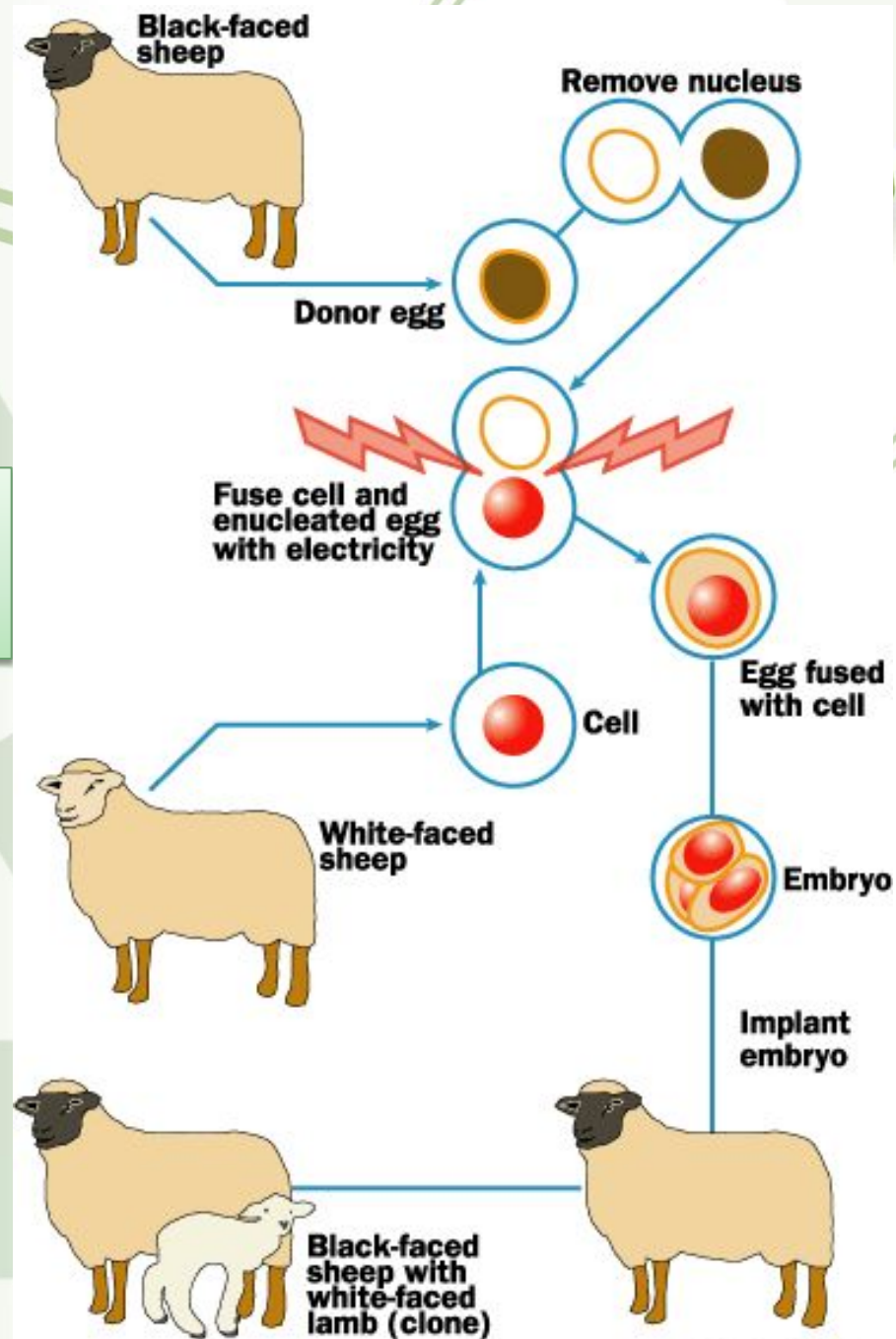


Зона пеллюцида – наружная белковая оболочка яйцеклетки



МЕТОДЫ СЛИЯНИЯ. ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИЯ

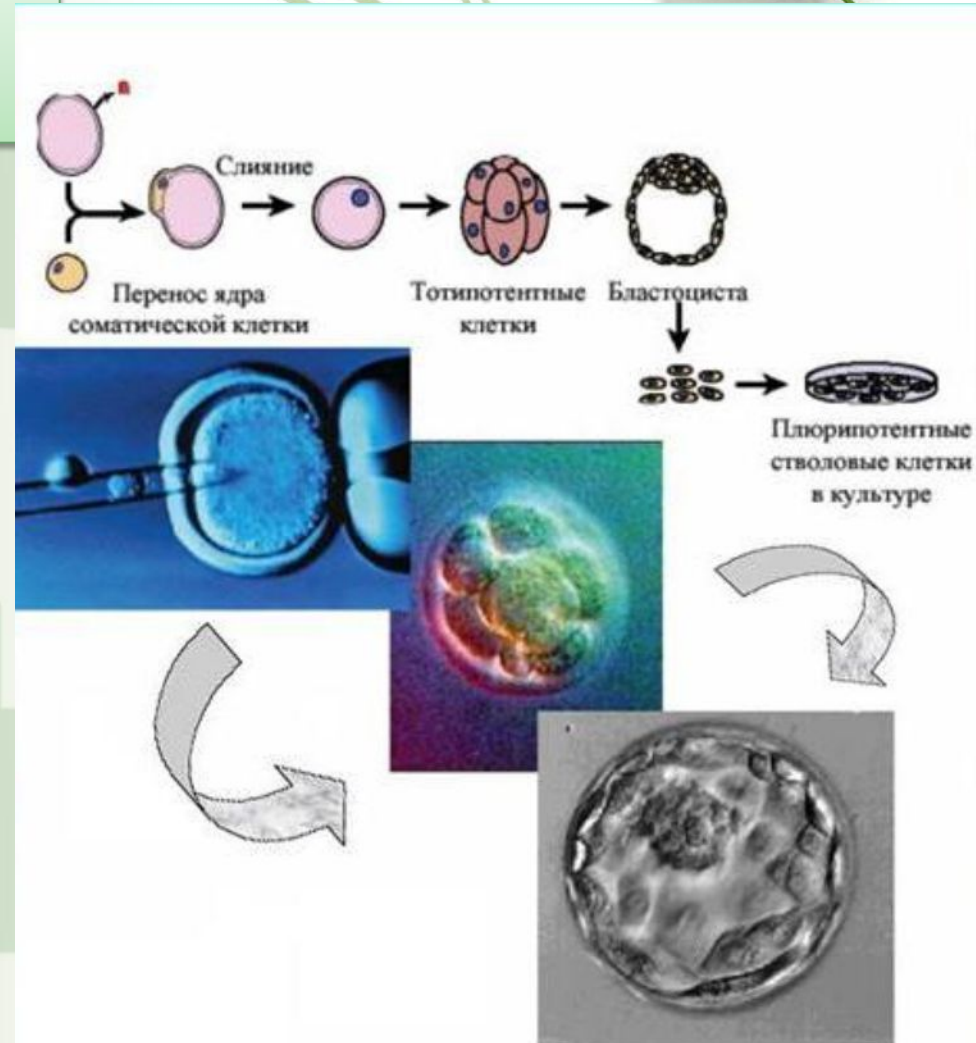
1. первый разряд – для слияния клеток
2. второй – для стимуляции механизма дробления



4 Этап. Процедура ЭКО или терапевтическое клонирование



Культивирование in vitro –
реконструированный зародыш
вступает в стадию дробления

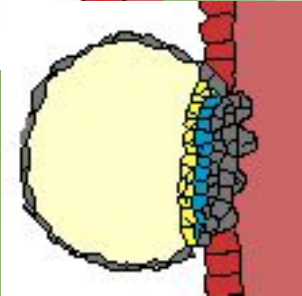


4 Этап. Процедура ЭКО или терапевтическое клонирование

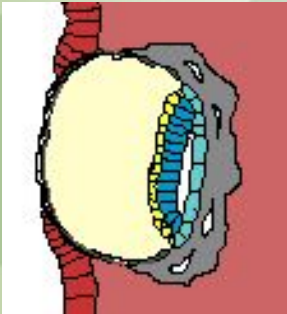
Предимплантационный зародыш помещают в матку суррогатной матери, либо развитие эмбриона останавливают



Бластоциста приближается к стенке матки

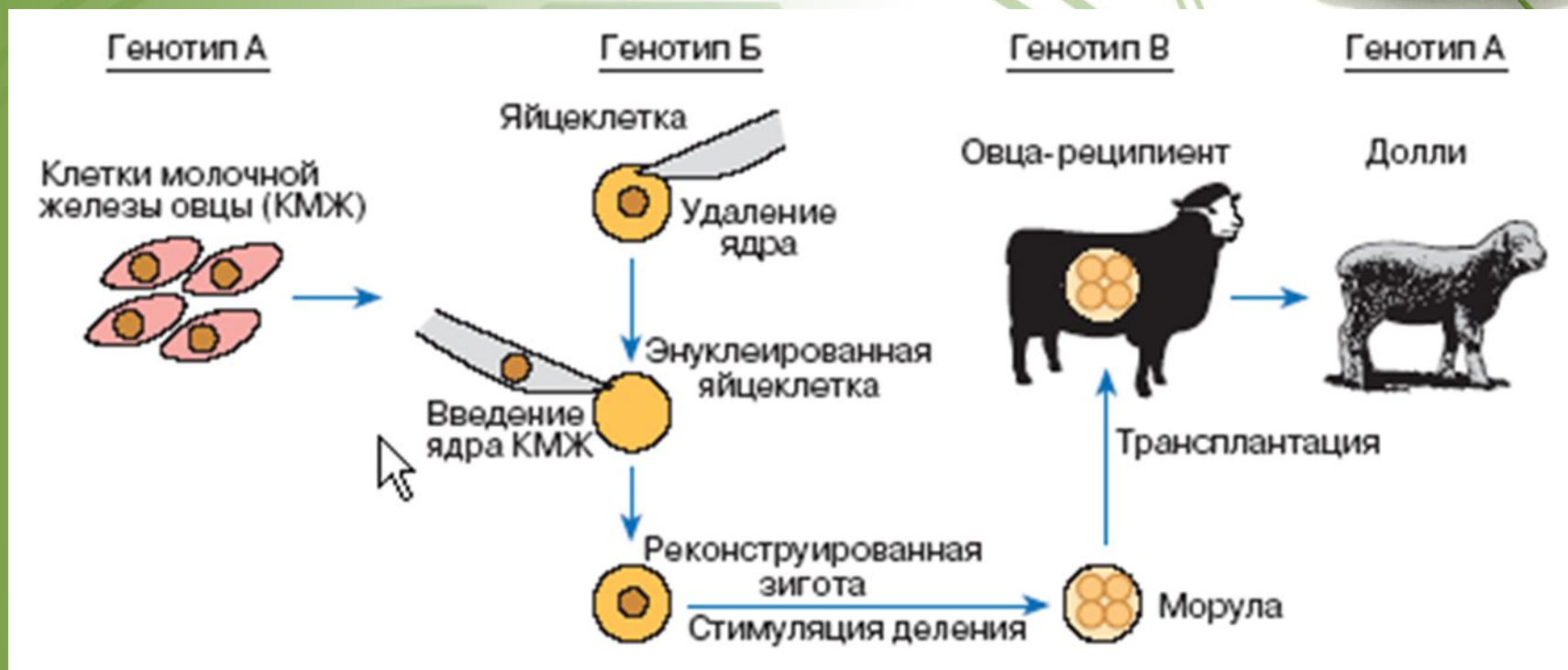
A diagram showing a cross-section of a blastocyst on the left. It consists of a yellow inner mass (inner cell mass) surrounded by a ring of grey cells (trophoblast) which is further enclosed by a red line (zona). To the right, a vertical red structure represents the uterine wall.

Бластоциста начинает внедряться (имплантироваться) под слизистую оболочку

A diagram showing the blastocyst from the previous stage now partially embedded into the red uterine wall. The grey trophoblast layer is breaking through the red line, and the yellow inner mass is visible.

Имплантация практически закончена

A diagram showing the blastocyst fully integrated into the uterine wall. The yellow inner mass is now surrounded by the grey trophoblast layer, which is fully embedded within the red uterine wall.



клонирование



```
graph TD; A(клонирование) --> B(репродуктивное); A --> C(терапевтическое);
```

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



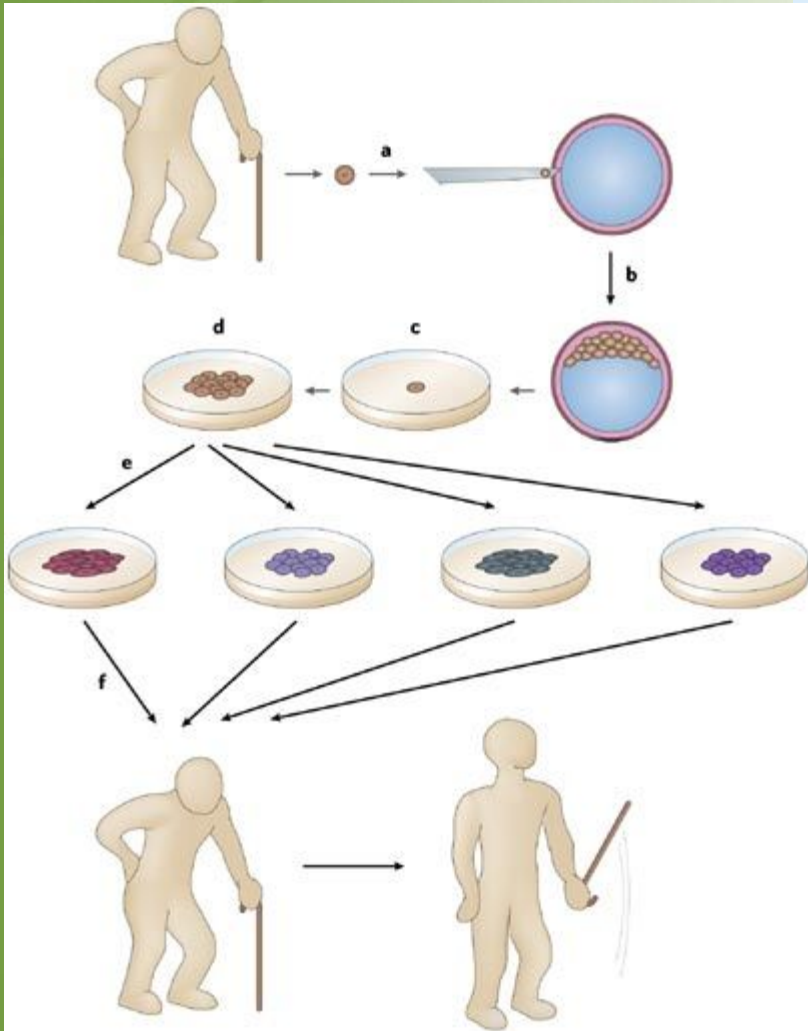
- **Фрагментирование предимплантационного эмбриона со стимуляцией последующего развития** (*таким путем были получены особи разных видов млекопитающих – мышей, коров, овец, лошадей*)
- **Пересадка ядер предимплантационных эмбрионов в энуклеированные клетки** (*клонирование земноводных – шпорцевой лягушки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

