ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ КЛОНИРОВАНИЕ. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ В ПОЛУЧЕНИИ ПАЦИЕНТ-СПЕЦИФИЧНЫХ ЛИНИЙ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Гены & Клетки: Том IV, №2, 2009 год, стр.: 28-31

Авторы

Свиридова-Чайлахян Т.А., Чайлахян Л.М.

Обзор посвящен актуальному биомедицинскому направлению в заместительной клеточной терапии — терапевтическому клонированию, которое является наиболее универсальным подходом для получения пациент-специфичных линий эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) с колоссальными возможностями в поддержании и восстановлении здоровья человека. В обзоре также представлены альтернативные подходы и тенденции в получении ЭСК 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 и в нашей стране.

**Введение**

Основой для возникновения одного из самых перспективных биомедицинских направлений в заместительной клеточной терапии — терапевтического клонирования явились два важнейших открытия конца XX века. Это, во-первых, создание клонированной овечки Долли [1], во-вторых, получение эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) из бластоцист [2] и примордиальных зародышевых клеток человека [3]. 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 ЭСК человека. Объединение этих двух важных достижений создает принципиальную возможность получения пациент-специфичных линий ЭСК и на их основе прогени-торных клеток, детерминированных в определенном направлении (например, клетки гематопоэтического ряда), которые, по существу, будут клетками самого пациента, и полностью с ним иммуносовместимыми. В этом состоит главный смысл и главная цель терапевтического клонирования. Сейчас 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 (СК) человека — с помощью технологий клонирования.

**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 СК. 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 резко беднеет 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 [4]. 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 в истории биомедицинской науки [5]. Обычно в репродуктивной практике получают примерно 24 овоцита от каждой женщины-клиента и лишь два-четыре 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 [6]. В то же время, специальный анализ, проведенный в США, Канаде, Англии, Австралии и в других странах 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 СК [7—\*10],

Совсем недавно в марте 2009 г. в США были законодательно разрешены исследования с эмбрионами и ЭСК человека в биомедицинских целях с проведением соответствующих клинических испытаний [11], хотя, фактически, эксперименты в этом направлении были начаты в 2006 г. в Гарвардском университете. Многомиллионные проекты по созданию клонированных человеческих эмбрионов с целью получения ЭСК были запущены также и в Австралии. С учетом этих фактов нет 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.

**Мировые тенденции развития терапевтического клонирования**

Огромные возможности технологий терапевтического клонирования пока продемонстрированы на животных модельных объектах. Первая работа по терапевтическому клонированию опубликована в 2000 г. и была выполнена на мышах [12]. В работе было показано, что линии ЭСК из клонированных эмбрионов состоят из клеток с такими же плюрипотентными свойствами, как и обычные ЭСК. Затем появились десятки таких работ и сделаны удачные попытки при использовании технологии клонирования корректировать имеющиеся у экспериментальных животных патологии, в частности, комбинированный иммунодефицит [13]. Тем самым были 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 [ 14—17]. И хотя в мире насчитывается уже около 500 линий ЭСК человека, однако ни одна из них не получена технологиями клонирования — методом пересадки ядер. Две сенсационные публикации в журнале «Science» [18, 19] за 2004 г. и 2005 г. южнокорейских ученых по получению для 11 тяжело больных пациентов индивидуальных линий ЭСК, оказались недостоверными. Имеется сообщение [20] 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 получение клонированных человеческих эмбрионов с ядрами фибробластов, которые развились до стадии бластоцисты, но при этом линии ЭСК из них не создавали [21 ].

**Альтернативные подходы в получении пациент-специфичных линий ЭСК**

Одновременно в мире ведется интенсивный поиск альтернативных возможностей для получения пациент-специфичных линий ЭСК 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 ЭСК 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 сут).

Первая успешная работа в этом направлении принадлежит группе китайских ученых [22], которые методом переноса ядер соматических клеток человека (фибробластов) в энуклеированные кроличьи овоциты получили гибридные реконструированные эмбрионы и затем линии ЭСК. Тщательный анализ показал, что эти ЭСК фенотипически сходны с обычными человеческими ЭСК, 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 [23] 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 ЭСК [24, 25]. Аналогичные попытки межвидовой пересадки ядер человека, предпринятые в США, оказались тоже неудачными [26]. На основании большой серии опытов по переносу ядер соматических (кумулюс-ных) клеток человека в овоциты человека и различных животных: коров, кроликов и мышей, было показано, что в гибридах человека и животных не достигается соответствующего репрограммирования ядер, как в клонированных человеческих эмбрионах, у которых паттерн генной экспрессии был, практически, идентичен с нормальными человеческими эмбрионами. Особенно критично, что в гибридных эмбрионах отсутствовала экспрессия генов плюрипотентности, что необходимо для получения СК.

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 [27, 28]. 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 [28]. Таким образом, на основании всех этих данных был сделан вывод, что овоциты животных не пригодны для использования в качестве реципиентов ядер человеческих клеток, и получение ЭСК человека из таких зародышей практически невозможно [26].

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 [29, 30], а затем с ЭСК человека [31, 32]. Стволовые клетки при слиянии с соматическими клетками являются поставщиками факторов, требуемых для эпигенетического репрограммирования генома соматических клеток с соответствующей индукцией плюрипотентных свойств и характеристик [33, 34]. Показана возможность репрограммирования ядер соматических клеток с помощью экстракта ЭСК [35] и предприняты попытки селективной элиминации ЗСК-хро-мосом [36, 37], 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 ЗСК-подобных клеток или индуцированных плюрипотентных линий СК CiPSD. Это новое направление исследований в заместительной клеточной терапии, начало которому положила работа ученых из Японии 2006 г. на мышах по перепрограммированию фибро-бла-стов до статуса, аналогичного плюрипотентному [38]. Вскоре была показана возможность такой трансформации для фибробластов человека [39]. Генетическую модификацию фибробластов проводили с помощью ретровирусной трансфекции четырех ключевых факторов плюрипотентности: 0ct3/4, Sox2, Klf4, с-Мус, и последующая экспрессия этих генов индуцировала репрограммирование соматических клеток с возвратом к плюрипотентному состоянию. Хотя эффективность такого подхода была очень низка, и известно также, что использование вирусных векторов может приводить к малигниза-ции iPS-клеток, эти работы стали сенсацией [40—42]. Последовала целая 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 [43—48]. В результате на мышах была показана возможность безопасного способа репрограммирования клеток с использованием транспозонов и всего одного фактора Klf4 [49].

Тем не менее, iPS-клетки преждевременно считать адекватной альтернативной заменой ЭСК для регенеративной терапии [50]. 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 позволяет в настоящее время рассматривать реконструированные эмбрионы человека как основной источник получения пациент-специфичных линий ЭСК.

**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 пока 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, сочетающие микрохирургию и электрослияние были разработаны впервые у нас в 80-х годах прошлого столетия [51]. Также имеются эффективные технологии получения линий человеческих ЭСК [52].

Реализовывать задачи терапевтического клонирования возможно на основе центров репродукции, которые помимо их прямого предназначения, могут стать центрами по получению линий ЭСК, в первую очередь, непосредственно для женщин — пациенток данного центра и любых членов их семей. Можно ожидать, что с развитием терапевтических технологий получение собственных ЭСК 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 [53]. Разработка таких приемов приведет к появлению нового класса микроманипуляционной аппаратуры, совмещающей различные оптико-лазерные микроинструменты (оптический пинцет, лазерный скальпель и т.д.) с компьютеризированным управлением. Следует ожидать, что 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.