

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное учреждение
Научно-исследовательский институт онкологии
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
**«Томский национальный исследовательский медицинский центр
Российской академии наук»**

**Н.В. Юнусова, Е.В. Кайгородова,
О.В. Кокорев, Р.Р. Салахов**

**МЕДИЦИНСКИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ
С ОСНОВАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ
(ИЗБРАННЫЕ ЛЕКЦИИ)**

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

Томск
Издательство СибГМУ
2023

УДК 57(075.8)
ББК 28.07я73
М 422

Авторы:

Н.В. Юнусова, Е.В. Кайгородова, О.В. Кокорев, Р.Р. Салахов

Медицинские биотехнологии с основами молекулярной биологии (избранные лекции): учебное пособие / Н.В. Юнусова [и др.]. – Томск: Изд-во СибГМУ, 2023. – 143 с.

Учебное пособие состоит из лекций по актуальным проблемам медицинских биотехнологий. Структура лекций соответствует основным разделам утвержденной рабочей программы по данной дисциплине для студентов медико-биологического факультета (классические и современные направления биотехнологии, биотехнология белков, биотехнологии в клинической практике). Материал настоящего сборника способствует формированию профессиональных компетенций для понимания основных методологических подходов в молекулярной биологии и медицинских биотехнологиях, основных этапов биотехнологических процессов, умению биомоделирования эксперимента и биотехнологического процесса.

Пособие подготовлено в соответствии с Федеральным образовательным стандартом высшего образования по специальностям: 30.05.01 – Медицинская биохимия: медицинские биотехнологии и 30.05.02 – Медицинская биофизика: медицинские биотехнологии.

УДК 57(075.8)

ББК 28.07я73

Рецензенты:

Тамкович Светлана Николаевна – кандидат биологических наук, доцент кафедры молекулярной биологии и биотехнологии факультета естественных наук Новосибирского государственного университета.

Першина Александра Геннадьевна – кандидат биологических наук, доцент исследовательской школы химических и биомедицинских технологий Национального исследовательского Томского политехнического университета.

Утверждено и рекомендовано к печати учебно-методической комиссией МБФ ФГБОУ СибГМУ Минздрава России (протокол № 3 от 2022 г.).

© Макет издательства СибГМУ, 2023

© Юнусова Н.В., Кайгородова Е.В., Кокорев О.В., Салахов Р.Р., 2023

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений	5
РАЗДЕЛ 1. ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ БИОТЕХНОЛОГИЙ. КЛАССИЧЕСКИЕ И СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЙ.....	7
Лекция 1. Интернализация нуклеиновых кислот, рецептор-лигандных комплексов и внеклеточных везикул. Механизмы интернализации в норме и при патологии	7
Лекция 2. Феномен РНК-интерференция, РНК-доставка, РНК-терапия	16
Лекция 3. Генная инженерия	25
Лекция 4. Генная терапия.....	33
Лекция 5. Системы редактирования генома. Система CRISPR-Cas	43
Лекция 6. Фармацевтическая биотехнология: общие вопросы, контроль и обеспечение безопасности условий эксплуатации биотехнологического производства	52
Лекция 7. Иммобилизованные ферменты и клетки, преимущества иммобилизованных ферментов и клеток в биотехнологическом производстве	62
РАЗДЕЛ 2. БИОТЕХНОЛОГИЯ БЕЛКОВ.....	70
Лекция 8. Методы оценки белковой экспрессии.....	70
РАЗДЕЛ 3. КЛЕТОЧНЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ	77
Лекция 9. Визуализация и иммунофенотипирование клеток: иммунофлюоресценция, проточная цитометрия, клеточный сортинг, иммуноцитохимия.....	77

РАЗДЕЛ 4. БИОТЕХНОЛОГИИ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ	99
Лекция 10. Экстракорпоральное оплодотворение: история развития и современное состояние метода.....	99
Лекция 11. Введение в регенеративную медицину.....	117
Лекция 12. Биоматериалы в имплантологии и тканевой инженерии	127
Рекомендуемая литература	141

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ	– антиген
АТ	– антитело
АТПКЛ	– аутотрансплантации полнослойного кожного лоскута
БТ	– биотехнология
ВВ	– внеклеточные везикулы
ВРТ	– вспомогательные репродуктивные технологии
ГМО	– генно-модифицированные организмы
ГнРГ	– гонадотропин релизинг гормон
дцДНК	– двуцепочечные ДНК
ДКМ	– децеллюляризированный матрикс кости
ИИ	– искусственная инсеминация
ИКСИ	– интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в яйцеклетку
ИФА	– иммуноферментный анализ (сокращённо ИФА, англ. enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA)
КВЗЭ	– кавеолин-зависимый эндоцитоз
КЗЭ	– клатрин-зависимый эндоцитоз
ЛГ	– лютеинизирующий гормон
мРНК	– матричная РНК
НК	– нуклеиновые кислоты
ПГД	– преимплантационная генетическая диагностика
пДНК	– плазмидная ДНК
РЗЭ	– рафт-опосредованный эндоцитоз
СГЯ	– синдром гиперстимуляции яичников
СД2	– сахарный диабет второго типа
ТМБ	– тетраметилбензидин
ФСГ	– фолликулостимулирующий гормон
ЭКО	– экстракорпоральное оплодотворение
CD	– кластер дифференцировки антигенов
CHO	– клетки яичников китайского хомячка
crРНК	– процессинг коротких CRISPR-РНК
dsРНК	– предшественники зрелой miРНК
FISH	– флюоресцентная гибридизация in situ
FRAP, FRET, FCS и FSM	– разновидности методик флюоресцентной микроскопии

GAPDH	– глицерадьдегид-3 фосфат дегидрогеназа
GPI-белки	– белки, связанные с гликозилфосфатидилинозитолом
miРНК	– микроРНК
pri-miРНК	– первичные miРНК
pre-miРНК	– предшественники зрелой miРНК
SDS-Na	– додецилсульфат натрия
siРНК	– короткие интерферирующие РНК
TLRs	– Toll-Like рецепторы
TSA	– Tyramide Signal Amplification
WB	– вестерн блоттинг
ZFNs	– цинковые пальцы

РАЗДЕЛ 1

ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ БИОТЕХНОЛОГИЙ. КЛАССИЧЕСКИЕ И СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЙ

ЛЕКЦИЯ 1

ИНТЕРНАЛИЗАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ, РЕЦЕПТОР-ЛИГАНДНЫХ КОМПЛЕКСОВ И ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ. МЕХАНИЗМЫ ИНТЕРНАЛИЗАЦИИ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Помимо функции хранения и переноса генетической информации, а также непосредственного участия в синтезе белков в форме рибосомальных и транспортных РНК, нуклеиновые кислоты (НК) внутри эукариотической клетки принимают активное участие в ее жизнедеятельности в качестве регуляторных молекул (нетранслируемые длинные и короткие РНК). Эукариотическая клетка встречается с НК экстраклеточного пространства (вирусные и бактериальные НК и НК собственного организма). Принципиально также выделяют НК природные и техногенного происхождения.

В отличие от клеток микроорганизмов, для которых перенос генетического материала между особями является эффективным и значимым процессом, клетки эукариот обладают целым рядом защитных механизмов, препятствующих проникновению в них чужеродных молекул ДНК и РНК, что в первую очередь связано с защитой от вирусов. Захват клетками НК в свободной форме (т.е. в отсутствие трансфицирующих агентов – в англоязычной литературе обозначается терминами «naked» или «free») в целом считается малоэффективным, что обусловлено представлениями о свойствах клеточной мембраны и самих НК (исключение может составлять процесс переноса НК в составе экзосом).

Поверхность эукариотических клеток имеет общий отрицательный заряд благодаря содержанию в мембране фосфатидилсерина, гли-

колипидов и гликопротеинов. Вследствие этого возникает электростатическое отталкивание между клеточной мембраной и молекулами НК, имеющими отрицательно заряженный сахарофосфатный остов, что снижает эффективность связывания НК с клетками. Транспорт плазмидной ДНК (пДНК) и других протяженных НК затруднен в связи с их относительно большим размером, жесткой пространственной структурой и невысокой подвижностью в биологических жидкостях и цитоплазме клеток.

Типы эндоцитоза отличаются друг от друга по наличию или отсутствию специфического покрытия образуемых везикул, по составу покрытия, по размеру везикул и дальнейшим путям утилизации поглощаемых веществ. В случае классического клатрин-зависимого эндоцитоза поверхностные рецепторы и связанные с ними лиганды взаимодействуют с адаптерными белками и многочисленными вспомогательными факторами, которые обеспечивают кластеризацию рецепторов в специализированных участках клеточной мембраны, стягиваемых клатриновой сетью. В инвагинации мембраны участвуют также другие белки (SNX9, амфифизин), отпочковывание везикулы происходит благодаря GTP-азе динамину. После этого эндосома быстро теряет клатриновое покрытие под действием ауксина и hsc70. Изначально размер везикул, образуемых при клатрин-зависимом эндоцитозе, не превышает 150 нм, но затем их объем существенно возрастает в результате слияния в зрелые эндосомы и последующего взаимодействия с лизосомами. По пути клатрин-зависимого эндоцитоза в клетки проникают многие важные рецепторы и лиганды, ЛПНП, трансферрин, различные рецепторы, связанные с активацией G-белков.

Кавеолы представляют собой небольшие инвагинации клеточной мембраны, содержащие кавеолин 1. Кавеолярный эндоцитоз играет важную роль в гомеостазе холестерина и транспорте гликофинголипидов; при участии этого механизма в клетки попадают некоторые вирусы, например, вирус SV-40, холерный токсин, GPI-белки. В некоторых случаях были описаны кавеолин- и клатрин-независимые пути эндоцитоза. Например, мембранные белки флотиллины способствуют организации липидных доменов, что может также приводить к эндоцитозной активности подобно кавеолярному пути. Некоторые авторы указывают, что в случае образования флотиллин, содержащих везикул, не требуется участие динамина.

Другим ключевым механизмом эндоцитоза является путь CLIC/GEES (аббревиатура расшифровывается как Клатрин- и Динамин-Независимая Транспортировка и GPI-AP-Обогащенный Ранний Эндосомальный Компармент). В этом случае происходит формирование крупных тубулярных эндосома, богатых GPI-белками – рафт-зависимый эндоцитоз.

При макропиноцитозе поглощение веществ клеткой происходит благодаря образованию крупных выпячиваний клеточной мембраны, формируемых с участием полимеризации актина. Макропиносомы не имеют специфического покрытия в отличие от кавеол и клатрин-зависимых эндосом и могут обладать достаточно большими размерами (до 5 мкм в диаметре). Формирование макропиносом происходит при участии сокращений цитоскелета (актин-миозинового комплекса), а потому подвержено регуляции Rac GTPаз и семейством РАК-киназ (p21-активируемые киназы). Динамин не нужен. Макропиноцитоз представляет эффективный способ неспецифического поглощения клеткой из внеклеточного пространства больших количеств растворенных соединений (рис. 1).

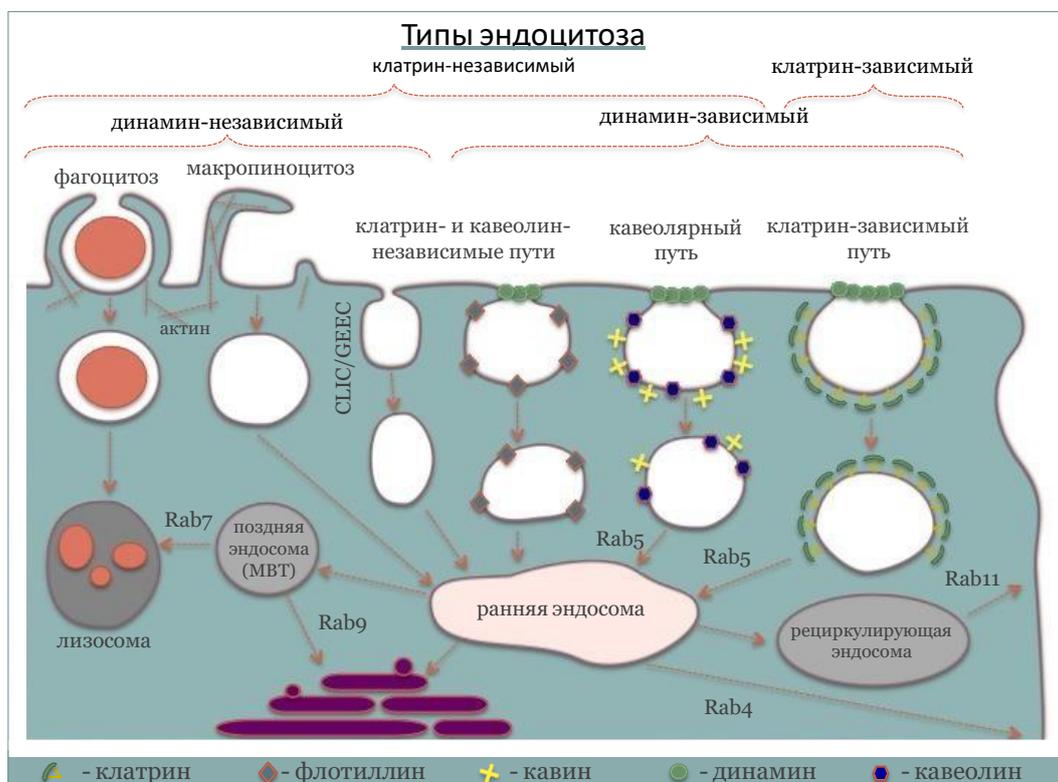


Рис. 1. Типы эндоцитоза

(<https://natworld.info/nauki-o-prirode/osobennosti-i-osnovnye-jetapy-receptorno-oposredovannogo-jendocitoza>)

Полагают, что наряду с механизмами эндоцитоза в поглощении НК играют роль специфические белки-переносчики. Наиболее убедительными примерами возможных клеточных рецепторов, связывающих олиго нуклеотиды, являются Toll-Like рецепторы. TLR9 связывает ДНК, содержащие CpG-богатые последовательности, TLRs7/8 связывает одноцепочечные РНК, тогда как TLR3 связывает двуцепочечные РНК. Как правило, эти рецепторы находят скорее в эндосомальных мембранах, чем на поверхности клеток, не исключено, что в некоторых случаях они действительно способны принимать участие в накоплении олигонуклеотидов внутри клеток. К примеру, известно, что присоединение CpG-мотива к siRNA может существенно повышать эффективность ее поглощения и биологического действия.

Внутриклеточные мембранные компартменты, в которые может пройти поглощенное вещество, включают ранние и рециркулирующие эндосомы, поздние эндосомы или мультивезикулярные тела, лизосомы, аппарат Гольджи и эндоплазматический ретикулум. Процесс внутриклеточной сортировки и транспорта как правило неслучаен и довольно строго организован.

- В экспериментах с эукариотическими клетками показано, что
- процесс интернализации НК в культуре клеток, как правило, малоэффективен;
 - результаты экспериментов по проникновению НК в клетки *in vitro* и *in vivo* могут не совпадать друг с другом;
 - интернализации коротких и длинных молекул НК в организме может происходить с привлечением иных механизмов или дополнительных факторов, позволяющих получать результаты трансфекции, превышающие ожидаемые;
 - введение свободной пДНК позволяет добиться продолжительной экспрессии доставляемого гена в случае трансфекции клеток, находящихся в постмитотическом состоянии (мышечная ткань), в том случае, если экспрессируемый белок не вызывает интенсивного иммунного ответа;
 - сложность детального исследования механизмов интернализации НК клетками в экспериментах *in vivo* связана с отсутствием экспериментальной модели, позволяющей воссоздать условия, в которых клетки находятся, функционируя как часть целостного организма;
 - наиболее вероятным механизмом интернализации НК в организме по-прежнему принято считать рецептор-опосредованный эндоцитоз.

Поэтому в биотехнологических целях часто используют модифицированные аналоги нуклеотидов. Введение модификаций приводит к изменению физико-химических и биологических свойств (растворимости в водной фазе, наличие заряда, степень деградации нуклеазами).

Эффективно введение адресующих и мембраносвязывающих групп.

Ковалентное соединение олигонуклеотидов с липофильными молекулами приводит к повышению эффективности связывания клеточными мембранами и биологической активности по сравнению с немодифицированными олигонуклеотидами.

Возможно присоединение к олигонуклеотидам различных лигандов, специфично связываемых рецепторами клеток определенного типа.

Фрагменты некоторых белков (10–15 аминокислот), обладающие способностью инициировать их транспорт внутрь клеток, – пептиды, проникающие в клетки (СРР) или белковые домены трансдукции, также могут быть использованы для направленной доставки НК в клетки.

Аптамеры – молекулы НК, обладающие высоким сродством к определенным белкам или небольшим молекулам. Присоединение аптамеров было использовано для направленной доставки в клетки-мишени антисмысловых олигонуклеотидов и siRNA.

По механизму рецептор-опосредованного эндоцитоза происходит интернализация мембранных рецепторов (например, рецепторов ростовых факторов, рецепторов апоптоза, рецепторов ЛПНП) или соответствующих рецептор-лигандных комплексов, что может модифицировать процессы пролиферации, апоптоза, формирования атеросклеротических бляшек.

Интернализация внеклеточные везикул (ВВ) происходит в норме более эффективно, чем свободных НК. ВВ представляют собой клеточные структуры сферической формы мембранного происхождения, их размеры варьируются от 40 до 5000 нм. Принято выделять несколько основных классов ВВ: мембранные везикулы/клеточные микрочастицы/экзосом, экзосомы и апостолические тельца. Эктосомы представляют собой крупные внеклеточные тельца размером от 130 до 1000 нм в диаметре. Особенности их образования связаны непосредственно с цитоплазматической мембраной, которая инвагинирует с последующим отделением образовавшегося пузырька. Апоптотические

тельца образуются в ходе блеббинга клетки, процесса образования в ней пузырьков, в ходе этого апоптотическое тельце формируется и получает характерное содержимое, фрагменты деградировавших клеточных органелл и хроматин. Экзосомы ВВ эндосомального происхождения размером от 30 до 130 нм. Среди всего разнообразия ВВ экзосомы привлекают к себе повышенный интерес. Это связано с гомогенностью фракции, отработанными подходами к выделению экзосом, большим разнообразием их функций, а, следовательно, и потенциалом применения в клинической практике. Липиды цитоплазматической клеточной мембраны и экзосомы сильно отличаются по своему составу. Мембраны экзосом, вынужденных существовать продолжительное время вне клетки, характеризуются повышенным содержанием сфингомиелинов, холестерина и фосфати-дилинозитола, что отвечает за большую устойчивость мембраны к протео- и липолитической активности за счет большей мембранной стабильности. Нетканеспецифические белки в составе экзосом представлены семейством тетраспанинов (CD63, CD81), другими трансмембранными протеинами (CD47, GNA), белками главного комплекса гистосовместимости (МНС), интегринами (ITGA/ITGB), трансферрин-связывающим рецептором (TFR2), белками семейства Rab, участвующими в клеточной адгезии. Тканеспецифические белки представлены тетраспанинами эпителиоцитов (TSPAN8), лейкоцитов (CD37, CD38), НК-клеток и В-лимфоцитов (CD9), иммуноглобулином эндотелиальных клеток (PECAM-1), а также рядом белков специфичных для различных опухолевых клеток, например, рака яичников, глиомы, рака молочной железы. Из нуклеиновых кислот экзосомы содержат главным образом РНК. Согласно последним данным, экзосомы содержат в себе почти все типы РНК, преимущественно матричную и микроРНК. МикроРНК экзосом участвуют в процессах регуляции экспрессии генов по механизму РНК-интерференции.

Для выявления наиболее предпочтительных для данного типа клеток механизмов интернализации ВВ могут использоваться ингибиторы клатрин-зависимого эндоцитоза (например, хлорпромазин и др.), caveolin-зависимого эндоцитоза (например, гинестеин, нистатин, филиппин и др.), ингибиторы рафт-зависимого эндоцитоза, которые различным способом разрушают липидные рафты (например, фуmozин В1, метил-бета-циклодекстрин, симвастатин и др.), ингибиторы макропиноцитоза (EIPA, LY294002), смешанные ингибиторы (например, диназор), ингибиторы абсорбции холестерина (например, эзетимиб и др.),

ингибиторы лизосомальной липазы (например, лалистат 2), лизосомотропные агенты и др. Из белок-белковых взаимодействий, важных для реализации интернализации везикул необходимо отметить механизмы с участием тетраспанинов, интегринов и механизм с вовлечением протеогликанов и лектинов.

Интернализация ВВ ассоциирована с развитием многих инфекционных и неинфекционных заболеваний (например, сахарного диабета второго типа – СД2). Количество, состав и функциональные особенности внеклеточных везикул от больных с нарушением толерантности к глюкозе и сахарным диабетом

Хотя свойства ВВ адипоцитарного происхождения стимулировать инсулинорезистентность при со-культивировании с различными клетками представлены в литературе, однако данные о количестве, составе и функциональной активности ВВ в контексте СД2, развивающегося на фоне инсулинорезистентности, представлены весьма ограниченно. В исследовании D.W. Freeman et al (2018) ВВ у больных с СД2, пациентов с нарушением толерантности к глюкозе (НТГ) и у эугликемических пациентов без признаков инсулинорезистентности выявлена значительно более высокая концентрация ВВ у лиц с диабетом по сравнению с людьми с эугликемией ($P=0,022$), причем эти изменения были более выражены для популяции белых американцев. С помощью проточной цитометрии было обнаружено, что пациенты с диабетом имеют значительно более высокий уровень CD235a-положительных (эритроцитарных) ВВ, а также тенденцию к повышению CD68-положительных (лейкоцитарных) и CD62p-положительных (тромбоциты/эндотелиальные клетки) ВВ. Уровни CD31+/CD146-положительных ВВ (эндотелиальные клетки) были сопоставимы между больными с диабетом и эугликемическими пациентами. В работе A. Gianella et al (2021) было обнаружено, что плохой метаболический контроль у пациентов с СД2 ассоциируется с более высоким уровнем ВВ тромбоцитарного происхождения по сравнению пациентами, имеющими нормальный уровень гликированного гемоглобина A1. Кроме того, уровень циркулирующих ВВ тромбоцитарного происхождения коррелировал с уровнем IL-6 в плазме крови, что также свидетельствует о связи чрезмерного выхода этих везикул из тромбоцитов с воспалением.

В циркулирующих ВВs идентифицировано несколько белков (фосфо-p70S6K [Thr389], рибосомального белка фосфоS6RP

[Ser240/244], фосфо-GSK3b [Ser9], фосфо-AKT[Ser473], активированный рецептор инсулина (phospho-IR) [Tyr], фосфо-IRS1 [Ser312], тир-фосфо-IRS1, активированный рецептор инсулинопобного фактора роста I типа (фосфо-IGF-1R [Tyr]), рецептор лептина и фактор роста фибробластов (FGF21), участвующих в реализации инсулинового каскада в клетках. Уровень лептинового рецептора и phospho-IR в циркулирующих ВВ были снижены у лиц с диабетом. Линейный регрессионный анализ показал, что индексы инсулинорезистентности НОМА-В и НОМА-IR были связаны с концентрацией ВВ и белками инсулинового каскада в ВВ. А именно высокий уровень НОМА-IR был связан с более низким уровнем фосфо-S6RP и высоким уровнем FGF21. Это в целом свидетельствует, что состав ВВ отражает различные компоненты диабета как на уровне сигнальных молекул, так и на системном уровне (инсулинорезистентность). Показано, что ВВ от пациентов с диабетом предпочтительнее интернализировались моноцитами (преимущественно классическими и переходными, и в меньшей степени неклассическими фракциями моноцитов) и клетками по сравнению с эугликемическими пациентами. Показано, что ВВ от больных с диабетом также могут ослаблять при интернализации клетками процессы, связанные с регуляцией окислительного стресса (регуляция окислительно-восстановительного потенциала клеток, метаболизм глутатиона). Суммарно, можно предположить, что интернализация ВВ, продуцирующихся в условиях гипергликемии и инсулинорезистентности подавляет пути реакции на окислительный стресс в моноцитах, что может сопровождаться дефектами фагоцитоза. Кроме того, выявлено увеличение IL-2, IL-4, и IL-12p70 в диабетических ВВ и IL-2 в средах от моноцитов, обработанные этими везикулами, что свидетельствует о возможности везикул модифицировать воспалительный ответ. В совокупности эти результаты свидетельствуют, что инсулинорезистентность увеличивает секрецию ВВ, которые предпочтительно интернализируются моноцитами и изменяют их функцию. Основные эффекты ВВ от пациентов с СДII, ассоциированные с их интернализацией моноцитами представлены на рисунке 2.



Рис. 2. Основные эффекты ВВ от пациентов с СДII, ассоциированные с их интернализацией моноцитами

ЛЕКЦИЯ 2

ФЕНОМЕН РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ, РНК-ДОСТАВКА, РНК-ТЕРАПИЯ

РНК-интерференция – естественный биологический процесс подавления экспрессии определенных генов, в основе которого лежит блок трансляции и/или деградация информационной матричной РНК (мРНК) под действием так называемых малых не кодирующих РНК. Явление РНК-интерференции было впервые описано А. Fire и С.С. Mello, получившими впоследствии за это открытие Нобелевскую премию. Суть явления состоит в процессинге малых РНК с образованием коротких 21–23-нуклеотидных двуцепочечных РНК и последующим их связыванием с гомологичными участками мРНК. В семействе малых некодирующих РНК выделяют несколько групп, к основным из которых относят микроРНК (miРНК) и короткие интерферирующие РНК (siРНК). Оба вида обладают сходной структурой и являются ингибиторами экспрессии генов, основные различия между ними заключаются в механизме образования, а также степени гомологии к целевым мРНК.

Предшественниками miРНК считаются первичные (primary) miРНК (pri-miРНК) эндогенного происхождения, транскрибируемые с соответствующих генов, кодирующих miРНК. Pri-miРНК. Они расщепляются до 70–100 нуклеотидных фрагментов под действием внутриядерного ферментативного комплекса Drosha до предшественников pre-miРНК, которые транспортируются в цитоплазму и подвергаются дальнейшему процессингу в мультиферментативной системе Dicer до зрелых miРНК. Зрелые miРНК представляют собой 21–23 нуклеотидные последовательности, которые не полностью комплементарны целевым мРНК. Соответственно, miРНК способны инактивировать одновременно несколько различных мРНК. В отличие от miРНК к предшественникам siРНК относятся короткие двуцепочечные РНК (dsРНК) как эндогенного, так и вирусного происхождения. siРНК обладают полной комплементарностью к целевым мРНК и, соответственно, являются высокоспецифическими ингибиторами синтеза белка.

Процессинг pre-miРНК и dsРНК с образованием соответственно miРНК и siРНК регулируется одной и той же ферментативной систе-

мой Dicer. Затем зрелые miРНК и siРНК связываются РНК-индуцируемым блокирующим комплексом RISC (RNA-Induced Silencing Complex), в котором переходят в одноцепочечное состояние с последующей деградацией одной из цепей, тогда как вторая цепь в комплексе с эндонуклеазой Argonaute 2, входящей в состав RISC, взаимодействует с комплементарными участками информационной мРНК, что приводит к деградации последней и/или блоку трансляции (рис. 3).

Использование малых РНК для направленной регуляции экспрессии генов

В 2001 г. впервые были описаны эффекты переноса малых РНК в эукариотические клетки. Дальнейшие исследования по таргетной доставке нано-частиц, несущих siРНК в человеческие клетки путем инъекций, послужили мощным толчком для развития новых подходов с применением РНК-интерференции в клинической практике. Пристальное внимание к РНК-интерференции, как к перспективному инструменту направленного воздействия на экспрессию генов, объясняется специфичностью действия, незначительными побочными эффектами, легкостью синтеза препаратов РНК. Правильно подобранные последовательности РНК могут избирательно ингибировать экспрессию генов, связанных с теми или иными нарушениями, такими как гиперэкспрессия онкогенов или мутации онкосупрессоров.

Однако, широкое использование РНК-препаратов в клинической практике ограничивается рядом факторов:

1. В физиологических условиях РНК нестабильна. Эффективное действие miРНК/siРНК предполагает их доставку к опухоли через кровеносное русло, однако при внутривенном введении молекулы деградируют с участием сывороточных нуклеаз, экскретируются почками, поглощаются фагоцитами и агрегируют с белками сыворотки. Таким образом, в естественных условиях интернализируется ничтожная часть циркулирующих некодирующих РНК. Нуклеазная активность в сыворотке крови и тканях является, по сути, первым барьером при доставке малых РНК. Основной нуклеазой плазмы является 3'-экзонуклеаза, однако разрывы меж-нуклеотидных связей могут происходить не только на 3'-конце, но и в середине молекулы РНК. Период полураспада miРНК/siРНК в кровеносном русле составляет от нескольких минут до 1 ч.

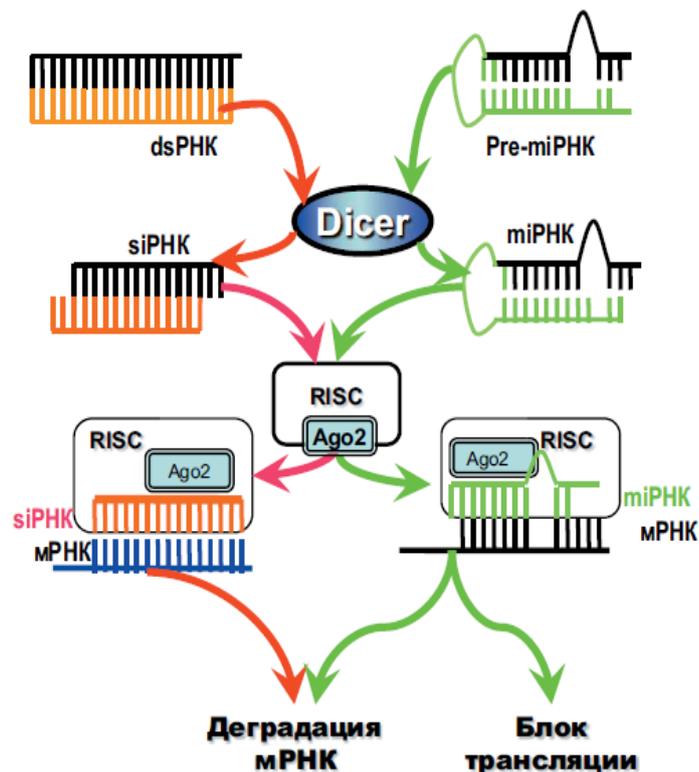


Рис. 3. Процессинг siРНК и miРНК в эукариотических клетках

Примечание. Предшественники малых РНК, dsРНК и pre-miРНК, поступают в рибонуклеазный комплекс Dicer, в котором подвергаются процессингу с образованием коротких двуцепочечных РНК, siРНК и miРНК соответственно. Зрелые siРНК и miРНК связываются РНК-индуцируемым блокирующим комплексом RISC, в котором переходят в одноцепочечное состояние с последующей деградацией одной из цепей. Другая цепь в комплексе с эндонуклеазой Argonaute 2 взаимодействует с комплементарными участками информационной мРНК, приводя к деградации последней и/или блоку трансляции (<https://myslide.ru/presentation/malye-interferriruyushhie-rnk>)

2. In vivo продемонстрировано преимущественное поглощение РНК именно почками. Дополнительный барьер для доставки miРНК/siРНК in vivo поглощение клетками ретикулоэндотитарной системой, в том числе циркулирующими моноцитами и тканевыми макрофагами, основными физиологическими функциями которых являются очистка от инородных патогенов, удаление клеточного дебриса и утилизация апоптотических клеток. Наибольшее количество тканевых макрофагов представлено в печени (купферовские клетки) и селезенке – органах с

высоким уровнем васкуляризации.

3. Попадая в клетки-мишени, РНК, находящиеся в свободном состоянии, быстро деградируют. Они накапливаются в ранних эндосомах, последовательно сливающихся с сортировочными эндосомами, содержимое которых, в свою очередь, направляется в поздние эндосомы. При этом уровень рН эндосомального компартмента значительно снижен (рН 5,0–6,2) по сравнению с рН (рН 7,4) цитозоля и межклеточного пространства. При слиянии поздних эндосом с лизосомами, короткие РНК деградируют при участии лизосомальных нуклеаз.

4. Свободная двуцепочечная РНК обладает гидрофильными и анионными свойствами и в свободном виде не может проникнуть в клетку. Для пересечения мембраны необходима упаковка РНК, связывание ее с каким-либо носителем.

Несмотря на эти ограничения, терапевтический потенциал малых РНК велик, однако на пути успешного применения препаратов miРНК/siРНК в клинической практике стоит проблема их специфической доставки, например, в опухолевые клетки.

Доставка малых РНК: химическая модификация и искусственные носители

Для системного введения РНК *in vivo* необходимо обеспечить одновременно несколько параметров:

- стабильность в сыворотке крови;
- не иммуногенность;
- незначительность связывания белками плазмы и нетрансформированными клетками;
- возможность избежать фильтрации почками;
- проникновение к клеткам опухоли через стенки сосудов;
- попадание в клетку и освобождение из эндосом;
- отсутствие токсичности.

Модификации молекул miРНК/ siРНК, позволяющие защитить их от действия нуклеаз, увеличивают их физиологическую стабильность. К таким модификациям относятся введение группы 2-О-метил и 2-диокси-2-флюоро, а также тиофосфатных линкеров. Несмотря на способность таких модификаций повышать стабильность miРНК/siРНК и увеличивать иммунологическую толерантность, этого оказывается недостаточно для обеспечения свободного прохождения РНК через отрицательно заряженную плазматическую мембрану.

Упаковка РНК в наноконтейнеры из катионных полимеров позволяет решить проблему заряда для транспортировки РНК через клеточную мембрану, однако основным ограничением их использования является иммуногенность полимеров. Основным путем выведения наночастиц из крови происходит посредством адсорбции на них иммунореактивных белков (опсонинов) и последующего поглощения мононуклеарами. Стратегия снижения связывания наночастиц белками плазмы заключается в использовании разветвленных полимеров полиэтиленгликоля, покрывающих поверхность наноконтейнера с РНК. Полиэтиленгликоль значительно увеличивает продолжительность их циркуляции в крови, защищая от взаимодействия с клетками иммунной системы и белками плазмы.

In vivo основным путем экскреции РНК связан с почками. Размер поры гломерул почек, через которые происходит фильтрация, составляет около 8 нм. Молекулы меньше 50 kDa, в том числе miРНК и siРНК массой 13 kDa, свободно проходят этот фильтр и экскретируются с мочой. Синтетические материалы, связывающие РНК и образующие наночастицы большего диаметра, используют для защиты РНК от гломерулярной фильтрации в почках, повышая их биодоступность. При этом часто применяют частицы размером более 20 нм.

В последнее время активно разрабатываются системы, в которых носителями miРНК и siРНК являются везикулы, мицеллы, липосомы и неорганические гибридные частицы. Основанием для разработки таких систем считается эффект повышенной проницаемости и накопления: наночастицы, размером от десятков до сотен нанометров, накапливаются преимущественно в опухолевых, а не в нормальных тканях благодаря аномальной структуре кровеносных сосудов, возникающих *de novo* при неоваскуляризации. Липосомы – синтетические частицы с липидной мембраной, которые содержат как гидрофобные, так и гидрофильные молекулы. РНК в составе липосом попадает в клетку путем эндоцитоза, поэтому для повышения избирательности липосом используют включение в их состав таргетных лигандов. Связываясь с рецепторами, экспонированными на мембранах таргетных клеток, такие частицы поглощаются по механизму рецептор-опосредованного эндоцитоза. В других системах используются пептиды, проникающие через мембрану (cell penetrating peptides), благодаря которым наночастицы могут проникать в клетку не только по механизму эндоцитоза, но и независимым от него образом.

В синтетических липосомах присутствуют, как правило, гидрофобные молекулы, которые образуют внутреннюю стенку мицеллы, и гидрофильные молекулы, формирующие оболочку. Гидрофильные участки содержат катионы и могут связывать отрицательно заряженные молекулы ДНК и РНК. Наноконтейнеры имеют тенденцию накапливаться в печени, легких, селезенке и почках, что влечет неизбежные токсические эффекты ограничивая их использование (рис. 4).

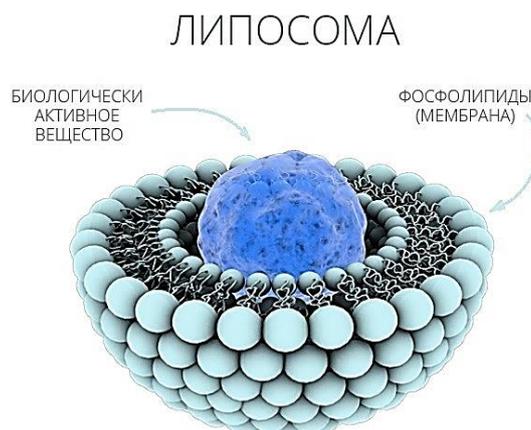


Рис. 4. Схема строения липосомы
(<https://dkv99.ru/kosmetika/liposomalnye-tekhnologii-v-medicine>)

Доставка малых РНК в опухолевые клетки с помощью экзосом

Среди различных видов секретируемых внеклеточных везикул (ВВ) выделяются экзосомы – мембранные везикулы диаметром 40–100 нм, по некоторым данным – до 130 нм, которые секретируются клеткой при слиянии внутриклеточных мультивезикулярных комплексов (эндосом) с плазматической мембраной.

Интересным свойством экзосом, с точки зрения генной терапии, является их способность осуществлять горизонтальный перенос генетического материала. А именно, в экзосомах от опухолевых клеток были обнаружены опухолевые маркеры и мРНК, которые *in vitro* транслоцировались моноцитам. В других работах описана способность микровезикул, секретируемых клетками-предшественниками эндотелиоцитов, активировать ангиогенные программы в эндотелиоцитах посредством селективного переноса мРНК. Экзосомы, продуцируемые клетками глиобластомы, также осуществляют перенос мРНК, которые меняют синтез белка *de novo* в реципиентных клетках.

Анализ связывания экзосом с клетками родительских линий и другими, в том числе иммортализованными, показал, что опухолевые клетки в целом гораздо активнее поглощают экзосомы. При этом нельзя достоверно утверждать, что они поглощают «свои» экзосомы, полученные от той же клеточной линии, с большей специфичностью, чем экзосомы от других источников, поскольку увеличивается и неспецифическое поглощение экзосом по причине активного эндоцитоза. Анализ физических свойств экзосом, полученных из культуральной среды линий РС3, MCF-7 и MDA-MB-231, не выявил различий, следовательно, можно сказать, что различная эффективность их поглощения клетками может определяться биологическими свойствами липидных и/или белковых компонентов экзосом.

Так, мембрана экзосом обогатена холестерином, сфингомиелином и отрицательно заряженным фосфатидилсеринем, что придает экзосомам прочность и стабилизирует их структуру. Помимо липидного состава к важным компонентам для связывания с поверхностью клетки относятся белки экзосом, основными представителями которых являются белки адгезии ICAM (intercellular adhesion molecule), интегрины, тетраспанины. Ключевая проблема в использовании экзосом для доставки РНК – загрузка РНК-препаратов в экзосомы. Для этого применяются несколько подходов, в том числе электропорация, химическая трансфекция и химическая модификация экзосом.

Электропорация. При использовании электропорации эффективность упаковки РНК в экзосомы не зависит от последовательности РНК, а эффективность трансфекции определяется правильным выбором параметров, условий и оборудования. Основной проблемой данного подхода является неправильная оценка эффективности фактической загрузки РНК в экзосомы, вызванная денатурацией РНК. Ранее было показано, что электропорация приводит к агрегации siРНК, поэтому эффективность загрузки siРНК, определяемая измерением флуоресценции, неадекватна и заметно завышена (фактическое содержание siРНК в экзосомах не превышало 0,05%).

Химическая трансфекция. Для загрузки РНК в экзосомы используют также липидные трансфекционные реагенты, такие как HiPerfekt и Lipofectamin 2000. Существенное ограничение этого метода – невозможность полного отделения от экзосом несвязавшегося трансфекционного комплекса РНК, что значительно затрудняет интерпретацию получаемых данных.

Химическая модификация экзосом. Основным подходом подразумевает предварительную трансфекцию донорских клеток векторными конструкциями в целях обогащения экзосом соответствующим белком. Впервые возможность использования модифицированных экзосом для таргетной доставки siРНК продемонстрирована в экспериментах на дендритных клетках. Незрелые дендритные клетки были трансфицированы плазмидой для экспрессии химерного белка экзосом Lamp2b, слитого с RVG (rabies viral glycoprotein) – пептидом, специфично экспрессирующимся в мозге. Экзосомы, несущие RVG, были получены из культур таких клеток и загружены siРНК GAPDH с помощью электропорации. Доставка таргетных RVG-экзосом *in vivo* путем инъекции в хвостовую вену привела к значительному подавлению GAPDH в нескольких областях мозга у мышей.

Исследования экзосом в качестве средств доставки РНК остаются, преимущественно, на стадии экспериментальных разработок, но работы в этом направлении ведутся активно. С этой точки зрения среди потенциальных кандидатов на роль доноров экзосом следует отметить иммортализованные мезенхимальные стволовые клетки, практически не вызывающих иммунологических реакций несовместимости, которые потенциально могут быть использованы в качестве средств доставки РНК. Для повышения специфичности экзосом разрабатываются конструкции, содержащие fusion-белки, в которых сигнальные пептиды или антитела к опухолевым антигенам фиксированы с поверхностными белками экзосом. Интерес представляет использование экзосом в качестве носителей не только siРНК, но и других типов малых РНК, в том числе miРНК, ингибиторов miРНК, плазмид для экспрессии shРНК. Среди успешно разработанных экспериментальных систем доставки малых РНК с помощью экзосом можно отметить эффективную доставку siРНК MAPK1 в моноциты и лимфоциты, siРНК RAD-51 (белок из семейства ферментов репарации), c-Cr, TGF- β 1, PLK-1 (polo-like kinase 1), а также доставку некоторых miРНК и/или их ингибиторов (рис. 5).

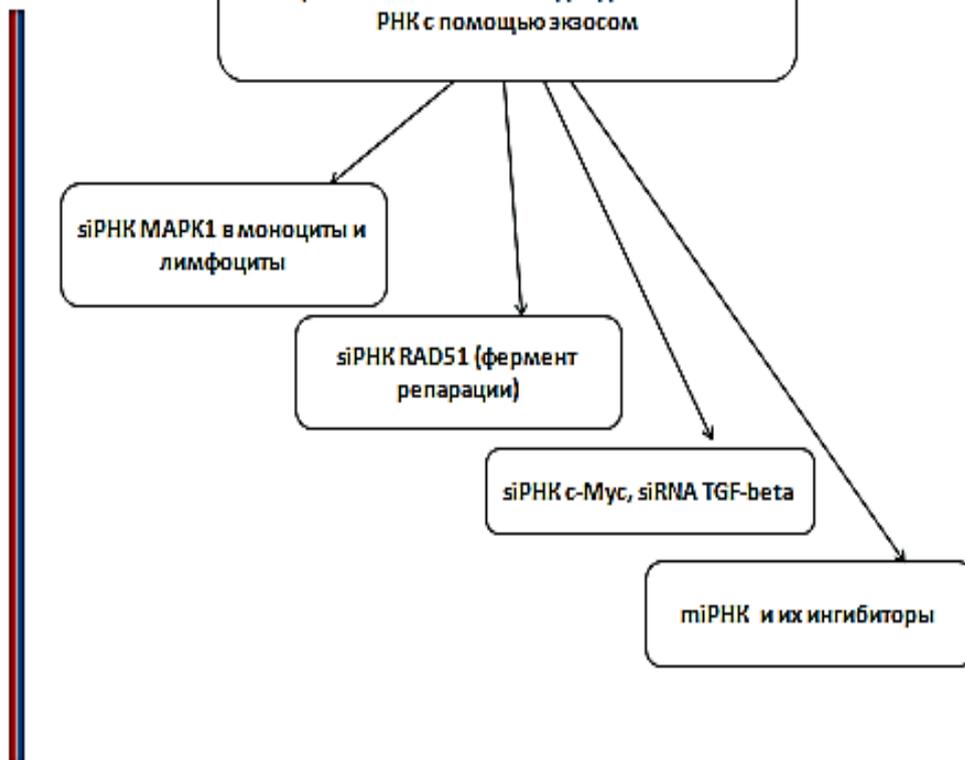


Рис. 5. РНК терапия опухолей. Успешно разработанные экспериментальные системы для доставки малых РНК с помощью экзосом

ЛЕКЦИЯ 3

ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Генетическая инженерия (генная инженерия) – совокупность приемов, методов и технологий получения рекомбинантных РНК и ДНК, осуществления манипуляций с генами и введения их в другие организмы. Генетическая инженерия не является наукой в широком смысле – это инструмент биотехнологии, который использует методы молекулярной и клеточной биологии, генетики, микробиологии, цитологии.

Ученые изолируют те или иные участки ДНК, соединяют их в новых комбинациях и переносят из одной клетки в другую. В результате удастся осуществить такие изменения генома, которые естественным путем вряд ли могли бы возникнуть.

Генная инженерия начала развиваться с 1973 г., когда американские исследователи Стэнли Коэн и Энли Чанг встроили бактериальную плазмиду в ДНК лягушки. Затем эту трансформированную плазмиду вернули в клетку бактерии, которая стала синтезировать белки лягушки, а также передавать лягушачью ДНК своим потомкам. Таким образом был найден метод, позволяющий встраивать чужеродные гены в геном определенного организма.

Основные этапы решения генноинженерной задачи следующие:

1. Получение изолированного гена.
2. Введение гена в вектор для переноса в организм.
3. Перенос вектора с геном в модифицируемый организм.
4. Преобразование клеток организма.
5. Отбор генетически модифицированных организмов (ГМО) и устранение тех, которые не были модифицированы.

Чтобы встроить ген в вектор, используют ферменты – рестриктазы и лигазы, являющиеся необходимым инструментом генной инженерии. С помощью рестриктаз ген и вектор можно разрезать на кусочки. С помощью лигаз такие кусочки можно «склеивать», соединять в иной комбинации, конструируя новый ген или заключая его в вектор. За открытие рестриктаз Вернер Арбер, Даниел Натанс и Хамилтон Смит также были удостоены Нобелевской премии (1978 г.).

Вектор – молекула ДНК или РНК, состоящая из двух компонентов: векторной части (носителя) и клонируемого гена.

Задача вектора:

- донести выбранную ДНК в клетку-реципиент,
 - встроить ее в геном,
 - позволить идентификацию трансформированных клеток,
 - обеспечить стабильную экспрессию введенного гена.
- Свойства, которыми должен обладать любой вектор:
- иметь небольшой размер,
 - быть способным поддерживаться в клетке-хозяине (реплицироваться),
 - многократно копироваться (амплифицироваться),
 - экспрессировать соответствующий ген (содержать соответствующие регуляторные последовательности),
 - иметь маркерный ген, позволяющий различать гибридные клетки для эффективной их селекции,
 - быть способен передаваться в клетку соответствующего организма.

Векторы

Плазмиды – кольцевые двухцепочечные экстрахромосомные самореплицирующиеся молекулы ДНК бактерий. В плаزمидах клонируют фрагменты ДНК до 10 т.п.н.

Фаги. Первыми были разработаны векторы на основе фага λ *E. coli*. ДНК фага λ составляет примерно 50 т.п.н. Значительная часть (20 т.п.н.) несущественна для размножения фага и может быть заменена на чужеродную ДНК. В фаге можно клонировать фрагмент ДНК до 20 т.п.н.

Космиды – векторы, объединяющие в себе свойства плазмиды и фага. Созданы искусственно. Могут амплифицироваться в бактерии как плазмиды и упаковываться в фаговые головки. Могут включать вставку чужеродной ДНК до 40 т.п.н.

Вирусы. Есть вирусы, которые не ведут к гибели клетки, но встраиваются в геном клетки-хозяина и размножаются вместе с ней, либо вызывают ее неконтролируемый рост, т.е. превращают в раковую. К таким относятся ДНК-вирусы SV-40 и вирус полиомы. Внедрение некоторых опухолевых РНК-вирусов ведет к отпочковыванию вирусных частиц от клетки без ее лизиса. К таким вирусам относятся, например, ретровирусы (вирус саркомы Рауса и СПИДа). Для бактериальных клеток в качестве вектора часто используют бактериофаги. Вирусы являются одними из главных кандидатов на роль векторов для введения

чужеродной ДНК. При вирусной инфекции каждая клетка может получить большое число копий чужеродного гена. ДНК можно встраивать так, чтобы она находилась под контролем сильных вирусных промоторов, что обеспечит высокий уровень экспрессии гена, и его продукты будут более доступны для исследования.

Недостатком вирусов как векторов является их небольшая емкость. Кроме того, вирусы заражают небольшой круг хозяев.

Транспозоны – сегменты ДНК, которые контролируют собственную транспозицию (перемещение) из одного сайта ДНК в другой путем вырезания из исходного сайта и внедрения в новый сайт хромосомы или плазмиды. Впервые были открыты в 40-х годах американской ученой Барбарой Мак–Клинтон у кукурузы. Эти гены, идентифицированные по их способности подавлять экспрессию других генов кукурузы, находящихся рядом с ними, не имели фиксированного положения в хромосоме. Они как бы передвигались по всему геному растения. Регуляторные элементы могли встраиваться и выщепляться, причем после их выщепления зачастую начинали функционировать ранее молчащие гены.

Искусственная дрожжевая хромосома (yeast artificial chromosome – YAC). Вектор разработан на основе ДНК дрожжей. Применяются для клонирования больших фрагментов ДНК (от 100 до 1000 т.п.н.) эукариот.

В последние годы сконструированы многочисленные «челночные» векторы и их рекомбинантные производные, способные к репликации в животной и бактериальной клетке и эффективно экспрессирующие клонируемый ген в животной клетке. Наиболее распространенные векторы состоят из плазмиды pBR322 и интактного раннего района транскрипции ДНК SV40, а нужный ген встраивается под контроль промотора поздних генов или дополнительного раннего промотора. Например, в ДНК SV40 был встроен ген β -глобина кролика, который экспрессировался в линии клеток обезьяны, зараженных рекомбинантным вирусом: в клетках, синтезировались и мРНК гена глобина, и сам белок (табл. 1).

Таблица 1

Емкости векторов разных классов

Вектор	Емкость (т.п.н.)	Применение
Плазмиды	15	Библиотеки кДНК
Бактериофаг лямбда	25	Геномные библиотеки Библиотеки кДНК

Космиды	30–45	Геномные библиотеки
PAC	70–90	То же
BAC	100–500	То же
YAC	250–2000	То же

Способы введения ДНК в бактериальные клетки

Значительные трудности были связаны с введением готового гена в наследственный аппарат клеток растений и животных. Однако в природе наблюдаются случаи, когда чужеродная ДНК включается в генетический аппарат клетки и с помощью её обменных механизмов начинает синтезировать «свой» белок.

Трансформация – это перенос чистой ДНК (произведенной другой клеткой) в бактериальную клетку. Только некоторые бактериальные клетки могут принять чистую ДНК. Говорят, что эти клетки обладают компетентностью. Даже компетентные клетки компетентны только в течение ограниченного периода своего жизненного цикла. В это время они продуцируют белки, называемые факторами компетентности, которые модифицируют клеточную стенку таким образом, что она может связать фрагменты чужой ДНК.

Конъюгация – это процесс, который у бактерий больше всего напоминает половой. Две клетки образуют цитоплазматический мостик, через который часть генетического материала переходит из одной клетки в другую. генетический материал имеет форму эписомы или плазмиды.

Трансфекция (трансдукция) – процесс переноса генетической информации от одной бактериальной клетки другой бактериальным вирусом или фагом (бактериофагом).

Наиболее распространенный метод – электропорация. Электропорация может реализоваться посредством

- шока электрическим полем высокой напряженности (3–5 мс),
- поляризации мембран,
- обратимого повреждения.

Нобелевский комитет Королевской шведской академии наук вручил Нобелевскую премию 2020 г. по химии за один из самых востребованных методов современной генетической инженерии, известный как «генетические ножницы», или CRISPR/Cas9. Лауреатами стали француженка Эммануэль Шарпантье и американка Дженнифер Дудна.

На открытие CRISPR/Cas9 будущие нобелевские лауреаты наткнулись относительно случайно: они изучали иммунную систему стрептококковых бактерий в поисках нового антибиотика. Вместо этого они увидели механизм точечного и направленного изменения ДНК. Технология CRISPR/Cas9 позволяет заметно упростить процесс редактирования генома. Самое сложное в этом процессе точно нацелиться на конкретный фрагмент ДНК.

Ранние технологии («цинковые пальцы») – способ редактирования точный, но очень трудоемкий. Преимущества CRISPR/Cas9: не требует столь высокой квалификации и позволяет ускорить процесс, в частности, легко перенацеливаться на разные области ДНК. Тогда как другие методы занимают месяцы или годы, CRISPR ускоряет это время до нескольких недель. Он позволяет вводить или удалять более одного гена одновременно. Он также отличается тем, что не является видоспецифичным, поэтому может использоваться на организмах, ранее устойчивых к генной инженерии.

Селекция трансформированных клеток осуществляется с помощью маркерных генов.

Можно выделить 2 группы маркерных генов, позволяющие отличить трансформированные клетки:

1. Селективные гены, отвечающие за устойчивость к антибиотикам (канамицину, тетрациклину, неомицину и др.), гербицидам (у растений). Это могут быть гены ауксотрофности по какому-либо субстрату и т.д. Основным принцип работы такого маркера – способность трансформированных клеток расти на селективной питательной среде, с добавкой определенных веществ, ингибирующих рост и деление не трансформированных, нормальных клеток.

2. Репортерные гены, кодирующие нейтральные для клеток белки, наличие которых в тканях может быть легко тестировано.

Чаще всего в качестве репортерных используются гены β-глюкуронидазы (GUS), зеленого флюоресцентного белка (GFP), люциферазы (LUC), хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT).

Применение в научных исследованиях

Нокаут гена. Для изучения функции того или иного гена может быть применен нокаут гена (gene knockout). Так называется техника удаления одного или большего количества генов, которая позволяет исследовать последствия подобной мутации. Для нокаута синтезируют такой же ген или его фрагмент, изменённый так, чтобы продукт гена потерял свою функцию.

Искусственная экспрессия. Логичным дополнением нокаута является искусственная экспрессия, то есть добавление в организм гена, которого у него ранее не было. Этот способ генной инженерии также можно использовать для исследования функции генов. В сущности, процесс введения дополнительных генов таков же, как и при нокауте, но существующие гены не замещаются и не повреждаются.

Визуализация продуктов генов. Используется, когда задачей является изучение локализации продукта гена. Одним из способов мечения является замещение нормального гена на слитый с репортерным элементом, например, с геном зелёного флуоресцентного белка.

Исследование механизма экспрессии. В таких экспериментах задачей является изучение условий экспрессии гена. Особенности экспрессии зависят, прежде всего, от небольшого участка ДНК, расположенного перед кодирующей областью, который называется промотор и служит для связывания факторов транскрипции. Этот участок вводят в организм, поставив после него вместо собственного гена репортерный, например, GFP или фермента, катализирующего легко обнаруживаемую реакцию.

Генная инженерия в современной медицине

Терапевтические нуклеиновые кислоты:

- генотерапия,
- репарация генов,
- антисмысловые РНК и олигонуклеотиды,
- олигонуклеотидные аптамеры,
- ДНК-вакцины.

Терапевтические белки (биофарминг):

- инсулин, гормон роста человека, факторы свертывания крови;
- Терапевтические небольшие молекулы
- антибиотики, хиральные метаболиты, витамины, аминокислоты (метаболическая инженерия).

Фармакогеномика

- предсказание побочного действия лекарств (цитохром P450) и исследование механизма их действия на экспрессию генов.

ДНК-диагностика:

- наследственные заболевания,
- инфекционные заболевания,
- приобретенные заболевания (в том числе рак).

Диагностические белки:

Маркеры заболеваний человека и животных,

Рекомбинантные вакцины, ДНК-вакцины

- гепатит В-экспрессия антигена на поверхности клеток дрожжей,
- антирабические вакцины (бешенство у животных),

Животные, моделирующие заболевания человека

- рак, атеросклероз, ожирение, аутоиммунные заболевания и т.п.

Научные факторы опасности генной инженерии

1. Генная инженерия в корне отличается от выведения новых сортов и пород. Искусственное добавление чужеродных генов сильно нарушает точно отрегулированный генетический контроль нормальной клетки. Манипулирование генами коренным образом отличается от комбинирования материнских и отцовских хромосом, которое происходит при естественном скрещивании.
2. В настоящее время генная инженерия технически несовершенна, так как она не в состоянии управлять процессом встраивания нового гена. Поэтому невозможно предвидеть место встраивания и эффекты добавленного гена. Даже в том случае, если местоположение гена окажется возможным установить после его встраивания в геном, имеющиеся сведения о ДНК очень неполны для того, чтобы предсказать результаты.
3. В результате искусственного добавления чужеродного гена непредвиденно могут образоваться опасные вещества. В худшем случае это могут быть токсические вещества, аллергены или другие вредные для здоровья вещества. Сведения о подобного рода возможностях ещё очень неполны.
4. Не существует совершенно надёжных методов проверки на безвредность. Более 10% серьёзных побочных эффектов новых лекарств невозможно выявить несмотря на тщательно проводимые исследования на безвредность. Степень риска того, что опасные свойства новых, модифицированных с помощью генной инженерии продуктов питания, останутся незамеченными, вероятно, значительно больше, чем в случае лекарств.
5. Существующие в настоящее время требования по проверке на безвредность крайне недостаточны. Они совершенно явно составлены таким образом, чтобы упростить процедуру утверждения. Они позволяют использовать крайне нечувствительные методы проверки на

безвредность. Поэтому существует значительный риск того, что опасные для здоровья продукты питания смогут пройти проверку незамеченными.

6. Созданные до настоящего времени с помощью генной инженерии продукты питания не имеют сколько-нибудь значительной ценности для человечества. Эти продукты удовлетворяют, главным образом, лишь коммерческие интересы.

7. Знания о действии на окружающую среду модифицированных с помощью генной инженерии организмов, привнесённых туда, совершенно недостаточны. Не доказано ещё, что модифицированные с помощью генной инженерии организмы не окажут вредного воздействия на окружающую среду. Экологами высказаны предположения о различных потенциальных экологических осложнениях. Например, имеется много возможностей для неконтролируемого распространения потенциально опасных генов, используемых генной инженерией, в том числе передача генов бактериями и вирусами. Осложнения, вызванные в окружающей среде, вероятно, невозможно будет исправить, так как выпущенные гены невозможно взять обратно.

8. Могут возникнуть новые и опасные вирусы. Экспериментально показано, что встроенные в геном гены вирусов могут соединяться с генами инфекционных вирусов (так называемая рекомбинация). Такие новые вирусы могут быть более агрессивными, чем исходные. Вирусы могут стать также менее видоспецифичными. Например, вирусы растений могут стать вредными для полезных насекомых, животных, а также людей.

9. Знания о наследственном веществе, ДНК, очень неполны. Известно о функции лишь трёх процентов ДНК. рискованно манипулировать сложными системами, знания о которых неполны. Обширный опыт в области биологии, экологии и медицины показывает, что это может вызвать серьёзные непредсказуемые проблемы и расстройства.

10. Генная инженерия не поможет решить проблему голода в мире. Утверждение, что генная инженерия может внести существенный вклад в разрешение проблемы голода в мире, является научно необоснованным мифом.

ЛЕКЦИЯ 4

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ

Генотерапия (генная терапия) – совокупность генно-инженерных (биотехнологических) и медицинских методов, направленных на внесение изменений в генетический аппарат соматических клеток человека в целях лечения заболеваний. Это новая и бурно развивающаяся область, ориентированная на исправление дефектов, вызванных изменениями в структуре ДНК, поражением ДНК человека вирусами или придания клеткам новых функций.

Генная терапия – новая область современной биомедицины, основанная на введении в организм больного рекомбинантных генетических конструкций с лечебной целью.

14 сентября 1990 г. – первое введение ретровирусного вектора, экспрессирующего ген аденозиндеаминазы (ADA) (частота встречаемости 1:100 000) двум больным, страдающим комбинированным иммунодефицитом ADA-SCID (недостаточность аденозиндеаминазы) (National Institute of Health (NIH), Bethesda, USA).

Классификация генной терапии

- 1) по типу клеток-мишеней:
 - ✓ соматическая,
 - ✓ фетальная
- 2) по цели воздействия:
 - ✓ позитивная (компенсация экспрессии гена),
 - ✓ негативная (подавление функций гена)
- 3) по тактике введения генотерапевтического агента:
 - ✓ ex vivo (клетки крови),
 - ✓ in situ (локально),
 - ✓ in vivo (системное введение),
 - ✓ in utero (введение конструкций в эмбрион)
- 4) по типу векторной системы:
 - ✓ вирусные векторы,
 - ✓ невирусные векторы,
 - ✓ микроинъекции,
 - ✓ «gene gun» (генный пистолет)
- 5) по применяемым агентам:
 - ✓ нуклеиновые кислоты,
 - ✓ белки,
 - ✓ иммунотерапия

Смена парадигм генной терапии:

- от «генетической» к генной терапии,
- от «пересадки» генов к пересадке клеток,
- от вирусных к невирусным векторам.

Фетальная генотерапия

При этом виде терапии генетическую конструкцию вводят в зиготу или эмбрион на ранней стадии развития (введение генов *in utero*). Ожидается, что введенный материал попадет во все клетки реципиента (и даже в половые клетки, обеспечив тем самым передачу следующему поколению).

При эмбриональной генной терапии доставка терапевтического гена может быть осуществлена путем его введения в амниотическую полость. Это привлекательно с точки зрения контроля за самой процедурой с помощью различных способов, начиная от ультразвука и заканчивая амниоцентезом (пункция плодного пузыря) и анализом образцов хориональных ворсинок. Подобные манипуляции могут использоваться в клинике и почти полностью безопасны для зародыша и матери. Доставку генетических конструкций в клетки плода можно осуществлять через эмбриональное кровообращение путем введения в пупочную вену.

В настоящее время уже введена в клинику процедура забора крови эмбриона с помощью иглы под контролем ультразвука. Такие манипуляции могут быть осуществлены с шестой недели беременности, если необходимо получить гемопоэтические клетки или доставить генотерапевтический вектор к недоступным органам.

Большинство методов фетальной генотерапии разработаны на трансгенных мышах. Чужеродную ДНК вводили в оплодотворенные яйцеклетки, полученные от мышей с искусственно стимулированной овуляцией. Затем яйцеклетки имплантировали в матку приемной матери. С помощью этого метода удалось заметно улучшить состояние мышей с наследственным дефицитом соматотропного гормона миелина.

В подобных экспериментах была получена важная информация о регуляции экспрессии генов и патогенезе наследственных болезней. Однако пока трансгенные животные получают только из 15–20% яйцеклеток с инъецированной ДНК, причем лишь у 20–30% животных введенный ген экспрессируется.

Более того, из-за случайного встраивания чужеродной ДНК в клеточный геном, есть опасность повреждения генов хозяина (инсерционный мутагенез), приводящего к дефициту белка или нарушению регуляции, что может стать причиной злокачественного новообразования.

Таким образом, фетальная генотерапия пока недостаточно разработана для лечения наследственных болезней человека. В то же время методы, разработанные в экспериментах с эмбриональными клетками, могут быть использованы для пренатальной диагностики наследственных заболеваний на ранней стадии внутриутробного развития. Можно сделать вывод, что фетальная генотерапия пока неприемлема для лечения наследственных заболеваний человека, в то время как соматическая генная терапия уже используется в клинической практике.

Соматическая генотерапия

При данном подходе генетический материал вводят только в соматические клетки, и он не передается половым клеткам. При соматической генной терапии генетические конструкции могут быть введены системно – *in vivo* (внутривенно, внутримышечно) и локально – *in situ* (сосуды, органы, опухоли), что наиболее предпочтительно и составляет основу терапевтических протоколов.

Генотерапевтические агенты:

Антисенс ДНК и РНК,

Рибозимы,

Peptide – nucleic acids (PNA),

РНК – ловушки.

Антисенс ДНК и РНК (рис. 6)

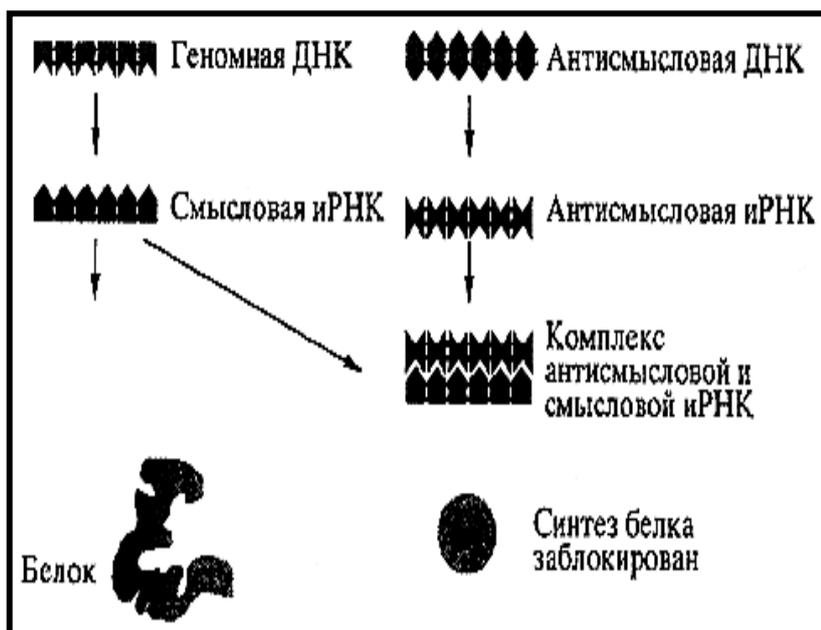


Рис. 6. Механизм действия антисмысловых ДНК и РНК

Преимущества:

- относительная специфичность дуплекса,
- возможность экспрессии в составе любого вектора
- отсутствие иммуногенности.

Недостатки:

- быстрая деградация (РНКазы, ДНКазы) в клетке.

Рибозимы (рис.7)

Преимущества:

- каталитические свойства (расщепление мишени),
- в процессе взаимодействия с мишенью молекулы не расходуются (ингибирование экспрессии гена – мишени при низких концентрациях),

- отсутствие иммуногенности,
- индукция интерферона.

Недостатки:

- быстрая деградация (РНКазы, ДНКазы) в клетке.

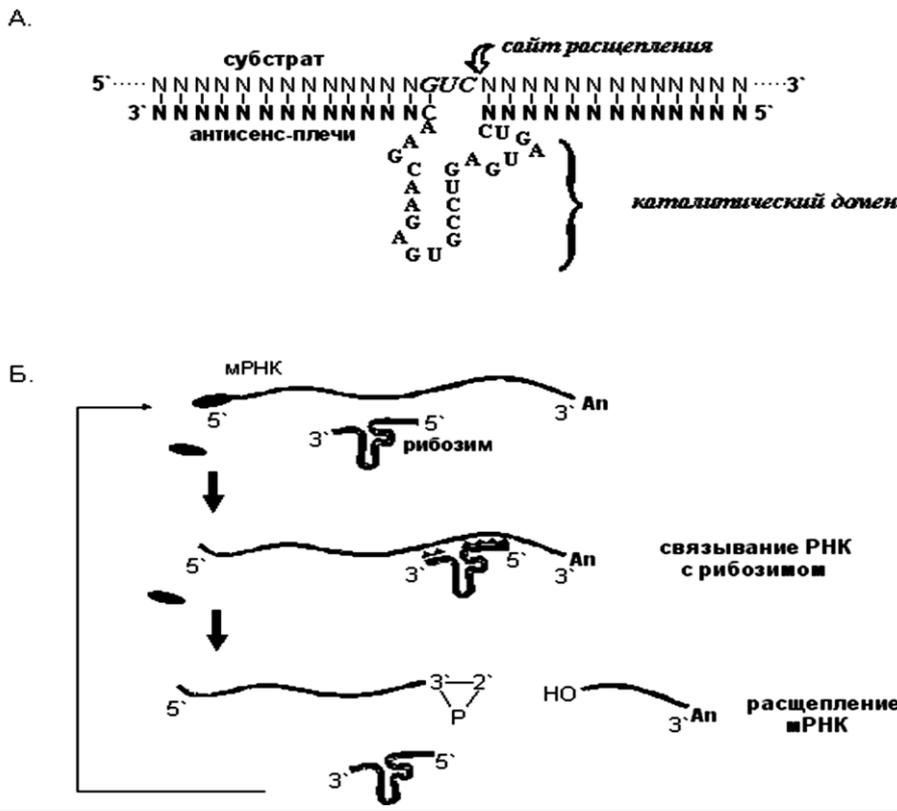


Рис. 7. Структура и механизм действия рибозимов:
А – структура рибозимов,
Б – механизм действия рибозимов

Пептид-нуклеиновые кислоты (peptide – nucleic acids (PNA))

Преимущества:

- дуплексы DNA/PNA более стабильны, чем дуплексы DNA/RNA;
- дуплексы DNA/PNA не подвержены действию RNase H, протеаз, пептидаз.

РНК-ловушки

Гиперэкспрессия коротких РНК (РНК – ловушки), направленных на cis-активаторные регуляторные элементы, могут использоваться как ловушки для trans-активаторных белков.

Механизм действия – блокирование связывания трансактиваторных белков вируса с регуляторными элементами.

Белки – генотерапевтические агенты:

Трансдоминантные негативные белки,
Одноцепочечные антитела (intrabodies),
Суицидные гены.

Трансдоминантные негативные белки – мутантная версия регуляторных или структурных белков.

Механизм действия:

- конкуренция за субстраты и кофакторы,
- образование нефункциональных мультимерных комплексов.

Преимущества:

- возможность использования в составе невирусных векторов.

Недостатки:

- иммуногенность.

Одноцепочечные антитела

Новый класс генотерапевтических агентов. Одноцепочечные варибельные фрагменты антител с сохраненными свойствами антиген-специфичности, получаемые клонированием и экспрессией генов легких и тяжелых цепей антител.

Преимущества:

- возможность экспрессии в гетерологичных системах,
- сохранение всех свойств классических антител.

Недостатки:

- отсутствие возможности к секреции (связаны с эндоплазматической сетью).

Суицидные гены

Вместо ингибирования (или компенсации) функции дефектного гена возможно использование суицидных генов, экспрессия которых вызывает гибель клетки-мишени. Примеры:

- А-цепь дифтерийного токсина,
- ген цитозиндеаминазы,
- ген тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV tk).

Bystander effect («эффект свидетеля»)

- распространение токсичных продуктов фосфорилирования GCV через межклеточные щелевые контакты,

- индукция специфического иммунитета,

- фагоцитоз апоптических везикул, содержащих метаболиты GCV.

Результат – гибель соседних клеток (генная терапия опухолей).

Экспрессия гена HSV tk (в виде составного белка с GFP) приводит к гибели клеток по механизму апоптоза.

Иммунотерапия

ДНК-вакцины,

Антиген-специфичные Т-лимфоциты.

ДНК-вакцины

Плазмидный вектор для экспрессии HBs антигена.

Преимущества:

- дешевизна производства,

- отсутствие иммуногенности (Анти-ДНК антитела),

- экспрессия продукта гена в нативной форме,

- индукция Т-клеточного иммунитета.

Недостатки:

- низкая эффективность доставки,

- низкая емкость векторов,

- высокая вероятность интеграции в геном клетки.

Антиген-специфичные Т лимфоциты

Лейкозы и лимфомы, возникающие вследствие патологического изменения или злокачественного перерождения В-лимфоцитов, имеют общий признак – они экспрессируют на своей поверхности белок или антиген под названием CD19. Когда развивается рак, лимфоциты не могут распознавать антиген и, вследствие этого, не могут атаковать и препятствовать размножению раковых клеток. Благодаря генной инженерии можно перепрограммировать лимфоциты и ввести в них генную информацию, чтобы эти клетки экспрессировали на поверхности химерный рецептор, или CAR-T, который будет распознавать опухолевый антиген (CD19) и разрушать злокачественные клетки.

Системы доставки генетического материала

Векторы:

- вирусные,

- невирусные.

Вирусные векторы:

- ретровирусы,
- аденовирусы,
- аденоассоциированный вирус,
- герпесвирусы,
- лентивирусы и др.

Преимущества:

- трансфекция большого количества клеток,
- тропизм,
- неспособность реплицироваться в клетке-хозяине
- устойчивость к деградации лизосомами.

Недостатки:

- иммуногенность (аденовирусы, герпесвирусы),
- потенциальная туморогенность (ретровирусы).

Аденовирусы

Преимущества:

- способны инфицировать неделящиеся клетки,
- большая клонирующая емкость (в настоящее время – до 28 т.п.о.),
- низкая вероятность встраивания в геном клетки-мишени,
- относительная простота производства,
- высокий титр при продукции в перmissive клеточных линиях.

Недостатки:

- иммуногенность (иммунный ответ развивается через 2–3 инъекции),
- транзientная экспрессия целевых генов.

Ретровирусы

Преимущества:

- не иммуногенны,
- постоянная экспрессия целевых генов.

Недостатки:

- инфицируют только делящиеся клетки,
- потенциальная туморогенность,
- низкий титр,
- небольшая клонирующая емкость (около 3.5 т.п.о.).

Невирусные системы доставки

- прямая инъекция,
- рецепторо-опосредованный эндоцитоз,
- генное ружье,
- липофекция,

- электропорация,
- полимерные носители.

Плазмидные векторы

Преимущества:

- отсутствие токсичности и мутагенности,
- практически неограниченная емкость вектора,
- дешевизна производства.

Недостатки:

- трансфекция ограниченной популяции клеток,
- дегградация ДНК лизосомами,
- отсутствие тропизма.

Физические методы доставки рекомбинантных плазмидных векторов:

- прямая инъекция «голого» гена в ткань (ДНК-вакцинация),
- кальций-фосфатная трансфекция,
- липофекция,
- электропорация.

Промоторы:

- ранний промотор цитомегаловируса человека (HCMV),
- тетрациклин-зависимый промотор CMV,
- промотор вируса саркомы Рауса (RSV),
- главный поздний промотор аденовируса человека 5 типа (MLP).

Маркерные гены:

- SEAP (secreted alkaline phosphatase),
- Бетта – galactosidase,
- G418 (neomycin),
- GFP (green fluorescent protein).

Клинические испытания генотерапевтических препаратов

I фаза. Оценка токсичности генной конструкции.

II фаза. Ограниченные испытания на небольшом контингенте больных.

III фаза. Широкомасштабные мультицентровые клинические испытания.

По состоянию дел на 2020 г. 63,4% протоколов и 68,4% пациентов – генная терапия злокачественных новообразований (цитокины и суицидные гены); 12,3% протоколов и 8,8% пациентов – генная терапия

моногенных наследственных болезней; 6,4% протоколов и 11,7% пациентов – генная терапия инфекционных заболеваний.

420 проектов (66%) – I фаза клинических испытаний.

134 проекта (21,1%) – между I и II фазами клинических испытаний.

4 проекта (0,6%) – III фаза клинических испытаний. Основные подходы в генокоррекции онкологических заболеваний представлены в таблице 2.

Таблица 2

Основные подходы в генокоррекции онкологических заболеваний

Принцип	Вводимые гены
Повышение иммунореактивности опухоли	Гены чужеродных антигенов, цитокины
Генетическая модификация иммунных клеток	Гены цитокинов, ко-стимуляторов
Доставка генов «чувствительности», суицидных генов	Тимидинкиназа HSV, ген аденозиндезаминазы
Блокирование экспрессии онкогенов	Антисмысловые РНК, одноцепочечные антитела
Доставка генов-супрессоров опухолей	p53
Защита интактных клеток от химиотерапии	Гены лекарственной устойчивости тип 1
Индукция синтеза противоопухолевых веществ нормальными клетками	Гены интерлейкина-2, интерферона
Продукция противоопухолевых рекомбинантных вакцин	Трансфекция дендритных клеток, вакцины типа БЦЖ, экспрессирующие противоопухолевый антиген
Локальная радиопротекция нормальных тканей с помощью антиоксидантов	Гены трансфераз, глутатион-синтетазы

Примеры третьей фазы клинических испытаний некоторых генотерапевтических препаратов

Генная терапия остеосаркомы

Частота встречаемости – 40 000 случаев в год (США).

Предпосылки – более 50% пациентов, имеют повышенный уровень экспрессии мутантной формы p53.

Генотерапевтический агент – фактор супрессии опухоли (кДНК p53).

Вектор – аденовирус тип 5.

Способ введения – прямая инъекция в опухоль.

Увеличение выживаемости в 2 раза.

Генная терапия метастатической меланомы (иммунотерапия)

Генотерапевтический агент – HLA-B7/Beta-2 Microglobulin cDNA.

Презентация антигенов МНС класса I на поверхности опухолевой клетки после экспрессии HLA-B7/Beta-2 Microglobulin cDNA.

Вектор-плазмидная ДНК в комплексе с катионными липосомами и DMRIE-DOPE.

Способ введения – прямая инъекция в опухоль. 31% пациентов не имели возврата опухоли в течение 6 лет.

ЛЕКЦИЯ 5

СИСТЕМЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА. СИСТЕМА CRISPR-cas

CRISPR (от англ. **clustered regularly interspaced short palindromic repeats**) – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами – особые локусы бактерий и архей, состоящие из прямых повторяющихся последовательностей, которые разделены уникальными последовательностями (спейсерами).

Спейсеры заимствуются из чужеродных генетических элементов, с которыми сталкивалась клетка (бактериофагов, плазмид). РНК, транскрибирующиеся с локусов CRISPR, обеспечивают адаптивный иммунитет за счёт комплементарного связывания РНК с нуклеиновыми кислотами чужеродных элементов и последующего разрушения их белками Cas. Участвует CRISPR в процессах, не только связанных с иммунитетом. Использование методик CRISPR-Cas для направленного редактирования геномов является перспективным направлением в современной генной инженерии.

История изучения

Первый локус CRISPR был обнаружен у бактерии *Escherichia coli* в 1987 г. группой японских учёных во главе с Ёсидзуми Исино. Они заметили в геноме этой бактерии повторяющиеся элементы, разделённые неповторяющимися последовательностями (спейсерами). Масштабное изучение CRISPR начал испанский исследователь Франсиско Мохики, в 1993 г. обнаруживший повторяющиеся последовательности, разделённые промежутками, в геноме археи. Мохики продолжил поиски CRISPR в геномах других микробов, и к 2000 г. он обнаружил их у 20 микроорганизмов. В 2002 г. были открыты гены cas – гены локусов CRISPR, кодирующие белки Cas. В 2005 г. Мохики и его коллеги опубликовали результаты своих новых исследований, в которых было установлено, что спейсеры соответствуют последовательностям из геномов бактериофагов, а также участкам плазмид. Они также обнаружили, что штаммы *E. coli*, чьи локусы CRISPR содержат спейсер, соответствующий фагу P1, устойчивы к этому фагу, и сделали вывод о связи локусов CRISPR с адаптивным иммунитетом прокариот.

В 2007 г. исследовательской группой во главе с Филиппом Хорватом было окончательно установлено и экспериментально доказано

участие CRISPR в обеспечении работы специфичного к последовательностям-мишеням адаптивного иммунитета; одновременно была выявлена ключевая роль белков Cas в этом процессе. Интерференция, направляющие РНК и нацеленность против специфических последовательностей ДНК – три открытия 2007–2008 гг., которые положили начало развитию основанных на CRISPR методов генетической инженерии.

В начале 2013 г. (с интервалом около двух недель друг от друга) несколько групп показали, что искусственные системы CRISPR могут работать не только в клетках бактерий и *in vitro*, но и в клетках эукариот.

В апреле 2015 г. группа учёных из Китая опубликовала результаты своего исследования, в котором с помощью CRISPR-Cas9 были отредактированы геномы человеческих эмбрионов. Однако точность редактирования в этом эксперименте была очень низка, а сам эксперимент был неоднозначно воспринят научным сообществом.

В начале 2016 г. учёные из США сообщили, что смогли понизить количество ошибок при работе CRISPR-Cas9 почти до нуля. В 2016 г. группа учёных выяснила, что системы CRISPR-Cas произошли от потерявших мобильность и закрепившихся в геноме транспозонов.

Системы CRISPR-Cas различаются как структурно, так и функционально.

Локусы CRISPR могут выполнять функцию иммунитета только при наличии генов cas, которые обычно располагаются в непосредственной близости от CRISPR. Набор генов cas определяет тип системы CRISPR-Cas. Локусы CRISPR представлены короткими (обычно около 30–40 нуклеотидов длиной) прямыми повторами, которые отделяются друг от друга неповторяющимися спейсерами, произошедшими из ДНК тех чужеродных генетических элементов, с которыми сталкивалась клетка или её предшественники.

Кроме структурного сходства, различные системы CRISPR-Cas объединяют три ключевых этапа работы CRISPR-опосредованного иммунитета:

- приобретение или адаптация,
- экспрессия,
- интерференция.

На этапе приобретения в CRISPR встраивается новый спейсер, образованный из инородного генетического элемента, проникшего в клетку. На стадии экспрессии происходят транскрипция CRISPR и

процессинг коротких CRISPR-РНК (crРНК), нацеленных на определённую мишень. В ходе интерференции рибонуклеопротеиновый комплекс crРНК-Cas распознаёт нуклеиновую кислоту-мишень за счёт комплементарного спаривания оснований мишени с crРНК, после чего разрезает мишень благодаря эндо- и/или экзонуклеазной активности белков Cas.

Интересно, что работа систем CRISPR-Cas имеет много общих принципиальных моментов с работой иммунной системы млекопитающих. Так, иммунизацию CRISPR (то есть вставку нового спейсера) может вызвать даже дефектный бактериофаг – подобно тому, как иммунный ответ млекопитающих может развиваться и при введении убитого патогена.

Приобретение спейсеров

Поскольку опосредованный CRISPR приобретённый иммунитет закодирован в ДНК, процесс иммунизации включает копирование и вставку чужеродных генетических элементов в CRISPR в качестве новых спейсеров. Большая часть данных о молекулярных механизмах приобретения новых спейсеров получена при изучении системы CRISPR I типа *Escherichia coli* и II типа *Streptococcus thermophilus*. Поскольку спейсеры передаются от предков к потомкам при делении клеток, при наличии схожих спейсеров можно устанавливать филогенетические связи между штаммами, имеющими общие предковые спейсеры, а также штаммами, имеющими новые, недавно приобретённые спейсеры.

Интерференция

На стадии интерференции crРНК связываются со своими мишенями за счёт спаривания оснований и, таким образом, направляют эндонуклеазы Cas на разрезание и разрушение мишени. Формирование комплекса crРНК и белков Cas обеспечивает эндонуклеолитическое разрушение комплементарных crРНК последовательностей нуклеиновых кислот. Хотя мишенями, в основном, являются двуцепочечные ДНК, некоторые системы CRISPR-Cas могут разрушать комплементарные одноцепочечные РНК.

Разнообразие систем CRISPR-Cas

Все известные системы CRISPR-Cas можно подразделить на два основных класса, 5 типов и 16 подтипов на основании наличия или от-

сутствия определённых генов cas, строения оперона cas, аминокислотных последовательностей белков Cas и механизмов, обеспечивающих работу CRISPR-опосредованного иммунитета.

Кроме того, существует система CRISPR-Rx10, которая нацелена на РНК (в отличие от других CRISPR, в частности, CRISPR-Cas9, мишенью которой является ДНК). За счёт этого CRISPR-Rx может подавлять экспрессию гена при неизменном генетическом коде.

Системы типа I являются наиболее распространёнными CRISPR-Cas-системами. Их мишенями служат двуцепочечные ДНК (дцДНК), а разрушение осуществляет эффекторный мультибелковый каскадный комплекс, связанный с белком Cas3.

Системы типа II активно используются в генной инженерии; для них характерно наличие эндонуклеазы Cas9. Мультибелковые комплексы, осуществляющие процессинг crРНК в системах типов I и III, в системах типа II заменены единственным белком – Cas9, который принимает участие во всех трёх фундаментальных этапах работы этой системы. Таким образом, системы II типа – наиболее простой тип системы CRISPR-Cas. Более того, в биогенезе crРНК принимают участие дополнительные элементы, уникальные для систем II типа. Системы II типа встречаются только у бактерий и среди систем типов I, II и III являются самыми малораспространёнными. Тем не менее, именно системы II типа нашли применение в качестве средства для редактирования геномов.

Системы III типа

Системы типа III часто встречаются у архей. Они могут распознавать как ДНК, так и РНК. Подразделяются на два подтипа: III-A и III-B. Для них характерно наличие белка Cas10 – самой крупной субъединицы эффекторного комплекса Csm (в случае подтипа III-A) и Cmr (в случае подтипа III-B). Кроме того, все системы III типа кодируют один белок Cas5 и, как правило, несколько паралогичных белков Cas7. Для обоих подтипов характерно использование ортолога Cas6 для процессинга пре-crРНК, хотя процессирующий фермент не всегда является стабильным компонентом соответствующего эффекторного комплекса (как у систем I типа).

Системы типа V редки и характеризуются наличием нуклеазы Cpf1, которую crРНК направляет к ДНК-мишени. Эта RuvC-подобная нуклеаза производит разрез на участке, находящемся дистально от 3'-конца РАМ. В отличие от Cas9 эта нуклеаза режет дцДНК с образованием не тупых, а липких концов длиной 5 нуклеотидов.

Системы CRISPR-Cas могут быть задействованы в регуляции вирулентности у патогенных бактерий.

Системы CRISPR-Cas задействованы в регуляции вирулентности у различных бактерий. У многих бактерий системы CRISPR-Cas используются для регуляции собственных генов, не связанных с вирулентностью. В частности, у *Pseudomonas aeruginosa* система типа I-F участвует в регуляции генов, связанных с образованием биоплёнки. Имеются свидетельства участия систем CRISPR-Cas в репарации ДНК. Так, Cas1, входящий в состав системы типа I-E *E. Coli*, может физически взаимодействовать с ферментами репарации и рекомбинации.

Противодействие CRISPR (Анти-CRISPR)

Установлено, что в ответ на распространение определённых спейсеров CRISPR в популяции бактерий (и, следовательно, распространение устойчивости к соответствующим бактериофагам) бактериофаги усиленно мутируют и даже утрачивают те участки генома, которые наиболее часто служат мишенями систем CRISPR-Cas и интегрируются в бактериальный геном в качестве спейсеров.

Некоторые фаги кодируют особые белки (анти-CRISPR белки, Acr), которые мешают работе CRISPR-Cas систем и способствуют развитию инфекции.

Применение в геномной инженерии

До открытия функций и механизмов действия систем CRISPR-Cas в качестве методов для локус-специфичного редактирования генома наиболее интенсивно разрабатывались методы, основанные на использовании нуклеаз, содержащих цинковые пальцы (ZFNs), а также эндонуклеазы TALEN (Transcription activator-like effector nuclease).

Эти методы довольно трудоёмки, не очень эффективны и дорогостоящи: для каждого нового локуса-мишени требуется разработка, экспрессия и проверка совершенно новой пары полипептидов, что значительно ограничивает область применения этих методов.

Однако, в 2012–2013 гг. в геномной инженерии появились принципиально новые методы манипулирования генетическим материалом, основанные на применении систем CRISPR-Cas. Данные методы пригодны для целенаправленного редактирования геномов как прокариот, так и эукариот (хотя последние не имеют собственных систем CRISPR-Cas, однако выяснилось, что искусственно введённые в эукариотную клетку элементы системы CRISPR-Cas бактериального происхождения способны функционировать и в новой среде).

При этом современные технологии CRISPR-Cas используют белок Cas9, одинаковый для всех локусов-мишеней, а специфичность действия определяется не белком, а crРНК.

Методы, основанные на CRISPR-Cas9, близки к естественным механизмам действия этих систем: для распознавания последовательности-мишени, используется РНК, и направляемая ею нуклеаза Cas9 производит двуцепочечный разрыв в сайте-мишени.

При редактировании генома эукариот, результатом работы CRISPR-Cas9 является не разрушение всей молекулы ДНК, а репарация двуцепочечного разрыва, произведённого Cas9. Репарация может проводиться как за счёт негомологичного соединения концов, так и путём гомологичной рекомбинации.

Репарация путём гомологичной рекомбинации, напротив, подразумевает замену удалённой последовательности новой последовательностью, комплементарной матрице для репарации, которую создаёт сам исследователь.

Таким образом, гомологичная рекомбинация может использоваться для:

- удаления нежелательных мутаций,
- создания новых аллелей,
- вставки или слияния функциональных доменов.

В этом случае к ДНК-связывающему домену можно присоединить домен с другими функциями, что, в свою очередь, может вызвать различные изменения в локусе-мишени:

- активацию или репрессию транскрипции,
- модификацию хроматина,
- усиление образования петель и многие другие.

Кроме того, инактивированная форма Cas9 (dCas9, «мёртвая» Cas9) служит основой для новых исследовательских приёмов, например, визуализации посредством флуоресценции или создания меток для последующей физической изоляции локусов.

В настоящий момент для редактирования генома применяют систему CRISPR-Cas II типа, причём чаще всего используется белок Spycas9; однако ведётся разработка альтернативных белков Cas9, которые позволят увеличить область применения CRISPR-Cas.

Биотехнологическое и медицинское значение

В настоящее время методы CRISPR-Cas успешно применяются в генной инженерии самых разных организмов: как многоклеточных и

одноклеточных (дрожжи) эукариот, так и прокариот. Применение CRISPR-Cas у микроорганизмов позволяет модифицировать их метаболические пути, что открывает возможности для развития новых биотехнологических стратегий. Важное значение для биотехнологии имеет создание штаммов технологически важных бактерий, устойчивых к различным фагам за счёт CRISPR-Cas.

Разработаны методы редактирования геномов с помощью CRISPR-Cas для модельных организмов (например, мышей, плодовой мушки, нематоды и других). Такие методы применялись для редактирования генома грибов, которые используют в промышленности для сбраживания сои и шампиньона.

В 2017 г. этим методом был отредактирован геном человеческих эмбрионов.

Ведутся работы по редактированию геномов с помощью CRISPR-Cas у крупного рогатого скота, свиней и других животных, имеющих важное хозяйственное значение, например, пчёл.

В ноябре 2015 г. были опубликованы результаты эксперимента, в ходе которого при помощи технологии CRISPR-Cas в геноме свиньи были разом инактивированы 62 эндогенных ретровируса. Авторы исследования надеются, что благодаря этим результатам в будущем станет возможной ксенотрансплантация органов от свиньи к человеку.

Наконец, мутагенез с использованием CRISPR-Cas может использоваться в борьбе с инвазивными видами животных (например, инвазивной мухой *Drosophila suzuki*). Технология CRISPR-Cas успешно применяется в геномной инженерии растений, в том числе декоративных растений и многих важных сельскохозяйственных культур: риса, сои, пшеницы, сорго, кукурузы, томата и апельсина.

Исследуются возможности внедрения систем CRISPR-Cas в культурные растения для создания противовирусного иммунитета. Для геномной инженерии растений также может использоваться система CRISPR-Cpf1.

Методы, основанные на CRISPR-Cas, могут найти применение и в медицине для лечения самых разнообразных заболеваний: вирусных (в том числе ВИЧ-инфекции и герпесвирусных инфекций), аллергии и иммунологических заболеваний, онкологических сердечно-сосудистых заболеваний и даже ревматизма, а также наследственных расстройств – таких, как синдром Дауна, серповидно-клеточная анемия, пигментный ретинит и β -талассемия.

В 2013 г. появилась публикация с сообщением о том, что исследователи сумели отредактировать аномальный ген в стволовых клетках пациента, больного муковисцидозом. Возможно, система CRISPR-Cas может помочь в лечении мышечной дистрофии Дюшена: показано, что с помощью CRISPR-Cas можно восстановить ген дистрофина в культуре клеток дистрофии Дюшена. Предполагается, что такие клетки с «отремонтированным» геномом можно трансплантировать в организм больного, где они смогут заменить больные клетки и выполнять необходимые функции

В октябре 2016 г. в Китае было произведено редактирование генома взрослого человека с помощью CRISPR/Cas: пациенту с раком лёгких ввели модифицированные с помощью CRISPR-Cas Т-лимфоциты. Исследователи полагают, что редактирование генома малярийного комара с помощью CRISPR-Cas способно помочь в борьбе с малярией. Показана возможность редактирования с помощью CRISPR-Cas генома другого важного патогенного простейшего – *Toxoplasma gondii*.

Система CRISPR-Cas может быть использована для получения из человеческих плюрипотентных клеток тканей, устойчивых к воспалению.

Линии клеток, модифицированных при помощи CRISPR-Cas, могут использоваться в качестве моделей различных заболеваний человека. Позже из этих клеток были выращены мини-органы, соответствующие почкам человека с данными болезнями. Этот же метод был использован для моделирования синдрома длинного QT на кардиомиоцитах. Подобные модели могут помочь в изучении заболеваний и разработке новых лекарственных препаратов.

Редактирование ДНК для противостояния заражению ВИЧ

В ноябре 2018 г. стало известно, что команде китайских учёных под руководством Хэ Цзянькуя удалось создать первых в мире людей с искусственно изменёнными генами (отключён CCR5) – двух девочек-близнецов, которые, как предполагается, невосприимчивы к вирусу иммунодефицита человека. Данный эксперимент был раскритикован из-за нарушения многочисленных научных и этических правил.

Использование Cas9 в генной инженерии

Кроме изначальной функции в бактериальном иммунитете, белок Cas9 активно используют для создания точечных разрывов в двойной спирали ДНК, такие разрывы могут приводить к инактивации генов

или созданию гетерологичных генов посредством соединения негомологичных концов и соответствующей гомологичной рекомбинации. К 2012 г. Cas9 приобрёл популярность, потому что он позволяет расщеплять практически любую нуклеотидную последовательность, комплементарную управляющей РНК. Поскольку избирательность Cas9 является следствием комплементарности управляющей РНК и ДНК, а не модификации самого белка (в отличие от случаев TALEN и ZFN), для новых ДНК-мишеней возможна выработка специфических Cas9. Предполагается, что Cas9 можно будет использовать для изменения генома целых популяций организмов.

Создана технология, которая позволяет редактировать отдельные «буквы» ДНК и РНК, не разрезая цепь ДНК, а путём преобразования одного нуклеотидного основания в другое, что позволит лечить врожденные заболевания, вызванные точечными мутациями.

Используя цитидин-дезаминазы или же аденозин-дезаминазы соединенные с dCas9 можно выключить экспрессию (путем введения преждевременных стоп-кодонов) или поменять сплайсинг необходимый для синтеза тех или иных белков.

Создана технология MAGESTIC, которая не только расщепляет ДНК, но ещё и доставляет к месту разрыва кусок ДНК необходимый для точной замены, что повышает точность и эффективность редактирования. Эта стратегия слияния, называемая CRISPR-хром, может быть использована для улучшения эффективности работы нуклеаз Cas9 при модификации генома CRISPR/Cas9 редактирование с праймером. Редактирование с праймером – в этом методе используется нуклеаза Cas9 соединенная с обратной транскриптазой и вместо обычной направляющей РНК используется так называемая regРНК. Этот метод, по мнению авторов, является более точным и универсальным, чем все разработанные до сих пор альтернативы CRISPR.

ЛЕКЦИЯ 6

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ: ОБЩИЕ ЧАСТНЫЕ ВОПРОСЫ, КОНТРОЛЬ И ОБЕСПЕЧЕНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ УСЛОВИЙ ЭКСПЛУАТАЦИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

Фармацевтическая БТ охватывает:

- разработку вакцин,
- синтез гормонов,
- ферментов,
- интерферонов,
- антибиотиков,
- аминокислот,
- витаминов,
- алкалоидов, полисахаридов и других биологически активных веществ (БАВ),
- рекомбинантных гуманизированных моноклональных антител.

Промышленный биотехнологический процесс, в котором для производства коммерческих продуктов используются микроорганизмы, обычно состоит из 3-х ключевых этапов:

1. Исходная обработка: обработка сырья для использования в качестве источника питательных веществ для микроорганизма-мишени.

2. Ферментация и биотрансформация: рост микроорганизма-мишени в большом (обычно более 100 л) биореакторе (ферментация) с последующим образованием нужного метаболита, например, антибиотика, аминокислоты или белка (биотрансформация).

3. Конечная обработка: очистка целевого продукта от компонентов культуральной среды или от клеточной массы.

Цель – максимальное повышение эффективности каждого из этих этапов и поиск микроорганизмов, с помощью которых можно получить целевой продукт. При использовании природных микробных штаммов выход конечного продукта часто оказывался существенно ниже оптимального.

С развитием технологий рекомбинантных ДНК появилась возможность оптимизировать этап биотрансформации (рис. 8).

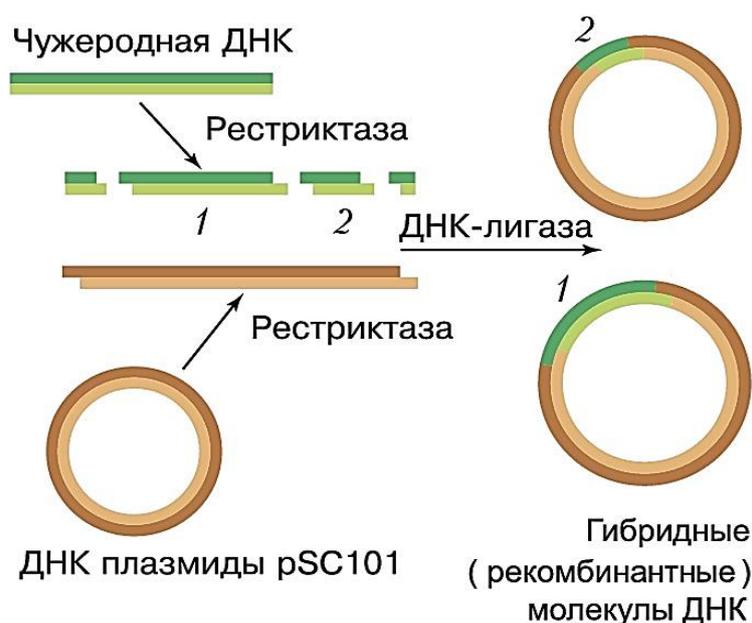


Рис. 8. Технология рекомбинантных ДНК
<https://bigenc.ru/biology/text/2350458>

Технология позволяет:

1. Встраивать *in vitro* в геном фрагменты ДНК из любых организмов.
2. Вводить полученные гибридные молекулы в перmissive клетки (как прокариотические, так и эукариотические).
3. Амплифицировать и экспрессировать в клетках клонированные чужеродные гены, которые при необходимости можно интегрировать в геном клеток.
4. Позволяет получать в больших количествах ценные низкомолекулярные вещества и макромолекулы, которые в естественных условиях синтезируются в минимальных количествах.

Наиболее эффективной, стабильной и удобной формой для катализа в БТ являются цельные организмы, вследствие чего в биотехнологии широко используются **микробиологические процессы**. Микроорганизмы обладают огромным генетическим пулом (фондом), позволяющим им осуществлять практически неограниченную биосинтетическую деятельность и потенциал деградации. Кроме того, микроорганизмам присущ исключительно быстрый рост, скорость которого намного превышает скорость роста высших организмов (растений и животных). Указанное свойство позволяет за короткий промежуток времени осуществить синтез больших количеств требуемого продукта в строго контролируемых условиях.

Исходя из температурного режима, который предпочитают те или иные микроорганизмы, их подразделяют на **термофилы** (от 45 до

90 °С и выше), **мезофилы** (от 10 до 47 °С) и психрофилы или **психротрофы** (от -5 до 35 °С). Микроорганизмы, активно размножающиеся лишь в определенном диапазоне температур – полезный инструмент для решения различных биотехнологических задач. Например, термофилы часто служат источником генов, кодирующих термостабильные ферменты, а генетически видоизмененные психротрофы используются при пониженной температуре для биodeградации токсичных отходов, содержащихся в почве и воде. Наиболее часто используемые в биотехнологии микроорганизмы представлены на рисунке 9.

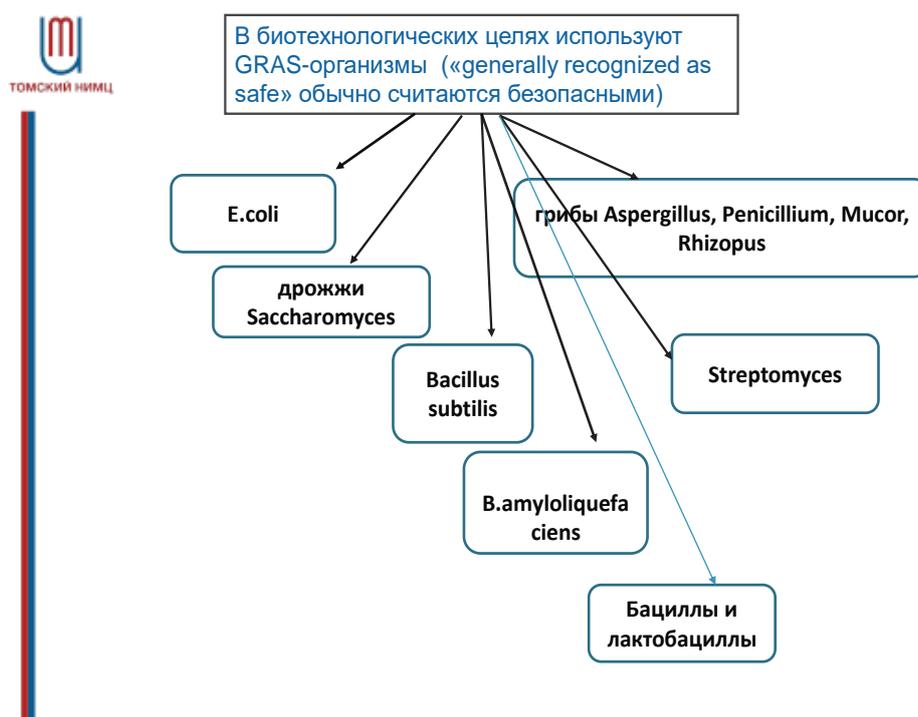


Рис. 9. GRAS -организмы

Для введения гена в клетку обычно используют векторные конструкции или методы прямого введения. Вектор – молекула ДНК или РНК, состоящая из двух компонентов: векторной части (носителя) и клонируемого чужеродного гена. Задача вектора донести выбранную ДНК в клетку-реципиент, встроить ее в геном, позволить идентификацию трансформированных клеток, обеспечить стабильную экспрессию введенного гена.

Основные типы векторов: бактериальные плазмиды, вирусы, космиды, вироиды. **Прямое введение гена в клетку осуществляют путем** трансфекции, микроиъекции, электропорации, методом «мини-клеток», упаковкой в липосомы, с использованием электронная пушка.

Достоинства *E. coli* в биотехнологическом производстве представлены на рисунке 10.

Бактерия *Esherichia coli*

<u>Преимущества</u>	<u>Недостатки</u>
<ul style="list-style-type: none">• Быстрый рост (6-12 часов от посева до окончания индукции)• Относительно высокий выход целевого белка (100-2000 мг/л)• Низкая цена ростовой среды (натуральные простые компоненты)• Низкая стоимость ферментации• Возможность получать микрокристаллы целевого белка (тельца включения)	<ul style="list-style-type: none">• Затруднен биосинтез крупных полипептидов (>50 кДа)• Нет системы гликозилирования• Ограниченные возможности секреции белков• Многие гетерологичные белки токсичны для клеток• Затруднено образование дисульфидных связей• Многие гетерологичные белки образуют только тельца включения

Рис. 10. Достоинства и недостатки *E. coli* в БТ-производстве

Примеры использования *E. coli* в фармацевтических биотехнологиях представлены на рисунке 11.

Эукариотические клетки, такие как Sp2/0, NS0 (клетки мышинной миеломы), PER.C6 (клетки сетчатки глаза человека), HEK-293 (клетки почки эмбриона человека), CHO (клетки яичников китайского хомячка) были главным образом выбраны для производства сложных липопротеинов, особенно для экспрессии моноклональных антител. Достоинства линии клеток CHO в биотехнологическом производстве представлены на рисунке 12. Примеры использования клеток линии CHO в фармацевтических биотехнологиях представлены на рисунке 13.

Рассмотрим процесс оптимизации БТ-производства лекарственных веществ на конкретном примере (синтез моноклональных терапевтических антител). Получение стабильной клеточной линии, производящей химерные антитела против ФНО-альфа, было осуществлено с использованием метода амплификации числа копий генов в дигидрофолат/метотрексатной системе.

E.coli – примеры использования

Белки

- Bactericidal/permeability-increasing Protein, rDNA
- Carboxypeptidase, rDNA
- G-CSF, rDNA/Amgen
- GM-CSF, rDNA/Schering-Plough
- Hyaluronidase, rDNA
- Insulin-like Growth Factor-1, rDNA/Tercica
- Interferon alfa-2a, rDNA
- Interferon alfa-2b, rDNA
- Interferon alfacon-1, rDNA
- Interferon betaser, rDNA/Berlex
- Interferon gamma, rDNA
- Interleukin-1ra, rDNA
- Interleukin-11, rDNA
- Interleukin-2, rDNA/Chiron
- Keratinocyte growth factor, rDNA
- Somatropin, rDNA/
- Somatropin antagonist, rDNA, PEG-
- T4 Endonuclease, rDNA, Liposomal
- TNF, rDNA
- tPA, rDNA/PDL
- Urokinase Plasminogen Activator, rDNA

Слитые белки

- Interleukin-13–Pseudomonas toxin, rDNA
- Interleukin-2/diphtheria toxin, rDNA

Вакцины

- Cholera Vaccine (rDNA)/SBL
- Staphylococcus vaccine (rDNA)
- Anthrax Vaccine, rDNA/VaxGen
- Lyme Vaccine, rDNA/Aventis
- Pertussis Toxoid, rDNA

Пептиды

- Calcitonin, rDNA
- Glucagon, rDNA/Lilly
- Insulin, rDNA/Lilly
- Insulin glargine, rDNA
- Natriuretic peptide, rDNA
- Parathyroid hormone (1-34), rDNA
- Parathyroid hormone (1-84), rDNA

Антитела и фрагменты

антител

- Complement C5 Mab, rDNA
- Heat shock protein Mab Mab, rDNA
- TNF Mab Fab', rDNA, PEG-
- VEGF Mab Fab, rDNA

Рис. 11. Использование E. coli в фармацевтических биотехнологиях

Линия клеток CHO

Преимущества

- Пригодна для белков любого размера
- Любые пост-трансляционные модификации
- Не содержит трансмиссивных вирусов
- Существует сублиния DG44, дефектная по гену DHFR (легкая амплификация кассет)



Недостатки

- Большое время создания продуцента (до 1 года)
- Медленный рост (промышленное культивирование до 200 дней)
- Требуется соблюдения полной стерильности и защиты от заражения вирусами
- Некоторые ферментные системы пост-трансляционных модификаций имеют ограниченные возможности и требуют сверхэкспрессии генов
- Ограниченный пролиферативный потенциал (до 25 пассажей)
- Дорогая культуральная среда

Рис. 12. Достоинства и недостатки линии CHO в БТ-производстве

Плазмиды pOptiVEC-L, pOptiVEC-H, pcDNA3.3-L и pcDNA3.3-H, содержащие гены легкой и тяжелой цепей химерного антитела к ФНО-альфа, были использованы для трансфекции суспензионной клеточной линии DG44 (dhfr-), производной линии CHO, не способной продуцировать дигидрофолатредуктазу. Для выяснения наиболее оптимального способа получения стабильной клеточной линии были использованы две комбинации плазмид, в результате чего были получены клеточные линии L1 и L2. Селекцию клеток проводили с помощью селективных агентов, гены устойчивости к которым имеются в плазмидных конструкциях. Из сравнения данных, приведенных на рис. 14А, следует, что продуктивность линии L2 превышает уровень продукции антител в линии L1.

CHO – примеры использования

Гормоны и цитокины

- Bone Morphogenic Protein-2, rDNA
- Bone Morphogenic Protein-7, rDNA
- EPO, rDNA/Amgen
- EPO, darb-, rDNA
- Corifollitropin alfa, rDNA
- FSH rDNA/Schering-Plough
- G-CSF, rDNA/Sanofi
- Luteinizing hormone, rDNA
- Interferon beta-1a, rDNA/Biogen
- Insulin-like Growth Factor-1/IGFBP-3, rDNA
- Thyroid stimulating hormone, rDNA
- hCG, rDNA

Ферменты

- Arylsulfatase B, rDNA
- DNase, rDNA
- Galactosidase, beta rDNA
- Glucocerebrosidase, rDNA
- Glucosidase, rDNA
- Iduronidase, rDNA

Антитела

- CD11a Mab, rDNA
- CD20 Mab, rDNA
- CD20 Mab, rDNA conc.
- CD20 Mab, rDNA/Y-90 & In-111 radioconj.
- CD52 Mab, rDNA
- EGF receptor Mab, human, rDNA/Amgen
- HER2 receptor Mab, rDNA
- Immunoglobulin E Mab, rDNA
- RANKL Mab, rDNA
- TNF Receptor-IgG Fc, rDNA
- VEGF Mab, rDNA
- CTLA4-Ig, rDNA
- LFA-3/IgG1, rDNA

Система свертываемости крови

- Factor IX, rDNA/Wyeth
- Factor VIII, rDNA/Baxter
- Factor VIII BDD, rDNA, PFM
- tPA, rDNA/Genentech
- tPA, TNK-, rDNA
- Thrombin, rDNA

Рис. 13. Использование линии CHO в фармацевтических биотехнологиях

В рамках оптимизации было исследовано влияние плотности клеточного инокулята и режима культивирования на уровень продукции антител. В методе «произвольного культивирования» клетки вносили в среду культивирования в минимальной необходимой концентрации 3×10^5 клеток/мл. Культивирование проводили без замены культуральной среды, при этом клетки росли без какого-либо вмешательства. Аликвоты отбирали каждые 48 ч.

Концентрацию антител оценивали по результатам ИФА (рис. 14Б). При плотности культуры 3×10^6 клеток/мл рост прекращается и в дальнейшем плотность начинает снижаться, что приводит к снижению секреции АТ.

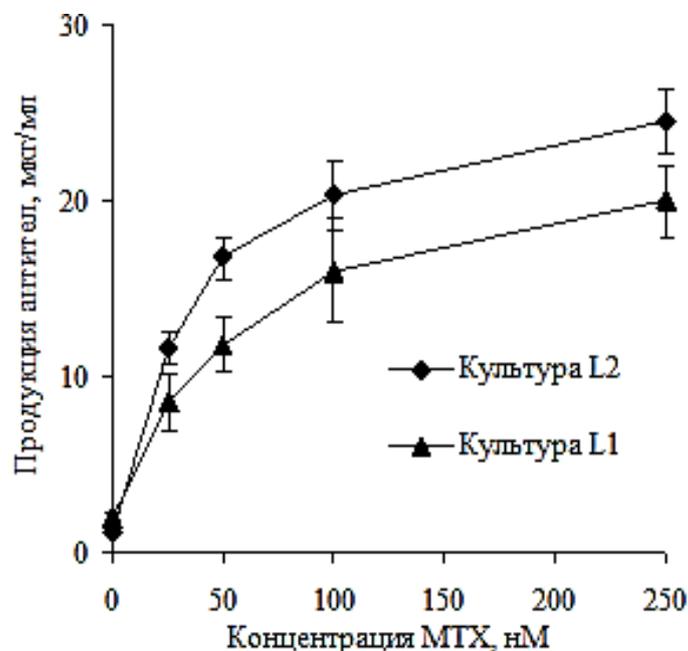


Рис. 14А. Продукция антител в клеточных линиях L1 и L2 в зависимости от концентрации метотрексата в среде культивирования (<https://s.science-education.ru/pdf/2011/5/84.pdf>)

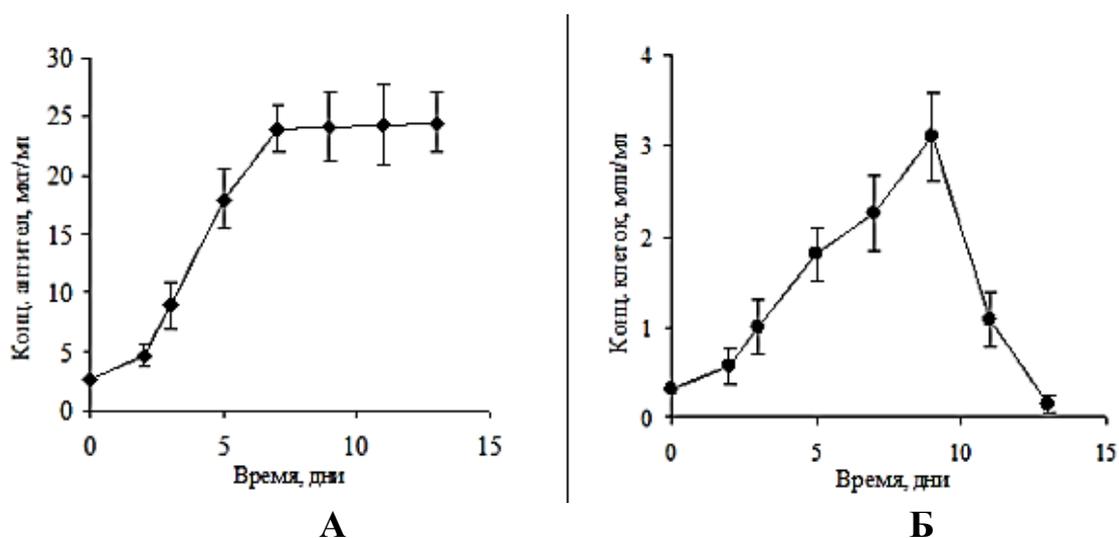


Рис. 14Б. Уровень продукции антител (А) и количество живых клеток в культуре (Б) при произвольном культивировании клеток линии L2

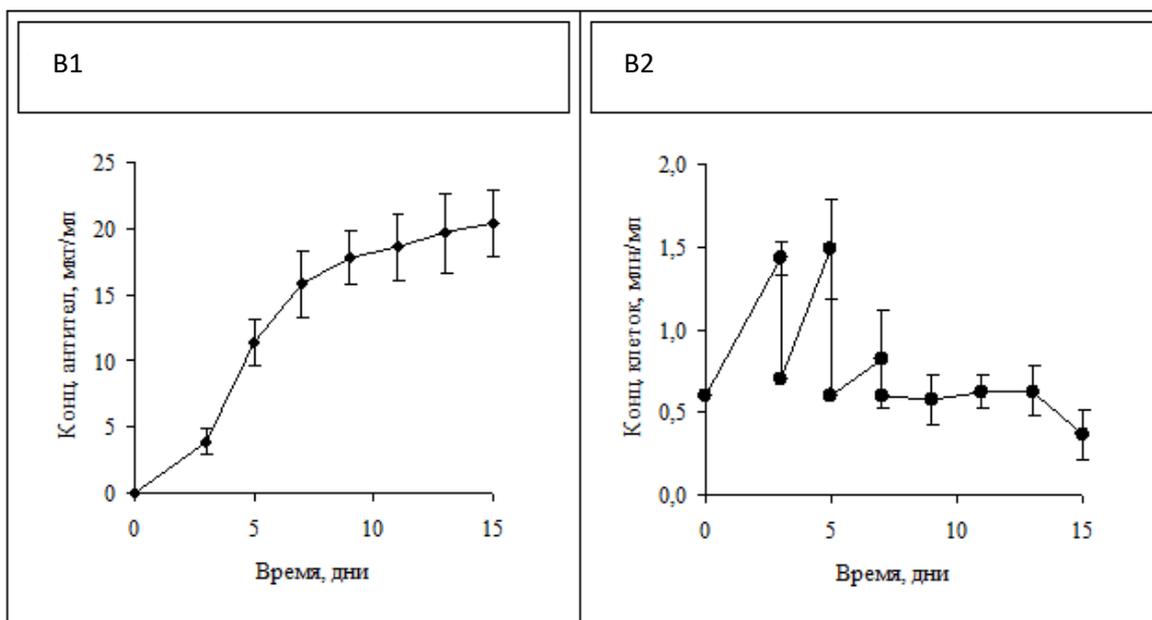


Рис. 14В. Уровень продукции антител (B1) и количество живых клеток (B2) при контролируемом уровне плотности культуры (<https://s.science-education.ru/pdf/2011/5/84.pdf>)

Принцип метода контролируемой плотности заключался в поддержании концентрации клеток в пределах, не допускающих контактного торможения культуры. Клетки вносили в культуральную среду в концентрации 6×10^5 клеток/мл. Клетки центрифугировались каждые 48 ч, после чего их вносили в ту же среду. Количество клеток поддерживалось в концентрации 6×10^5 клеток/мл. Данный подход позволял клеткам свободно делиться и поддерживать высокий уровень пролиферативной активности (рис. 14В).

Была также исследована возможность культивирования клеток стабильной клеточной линии в биосовместимых полупроницаемых полиэлектролитных микрокапсулах, а также изучена кинетика накопления антител в культуральной среде. Микрокапсулирование клеточной линии СНО L2 осуществляли путем приготовления 1,5 мл микрокапсул и 1,5 мл гранул на 30 мл среды, что соответствовало плотности 3×10^5 клеток/мл культуральной среды. В качестве контроля использовали суспензионную культуру СНО L2 (рис. 15).

Документы, регламентирующие деятельность предприятий, на которых осуществляется биотехнологическая деятельность, а также принципы сортировки и утилизации отходов биотехнологического производства представлены на рисунках 16–18.

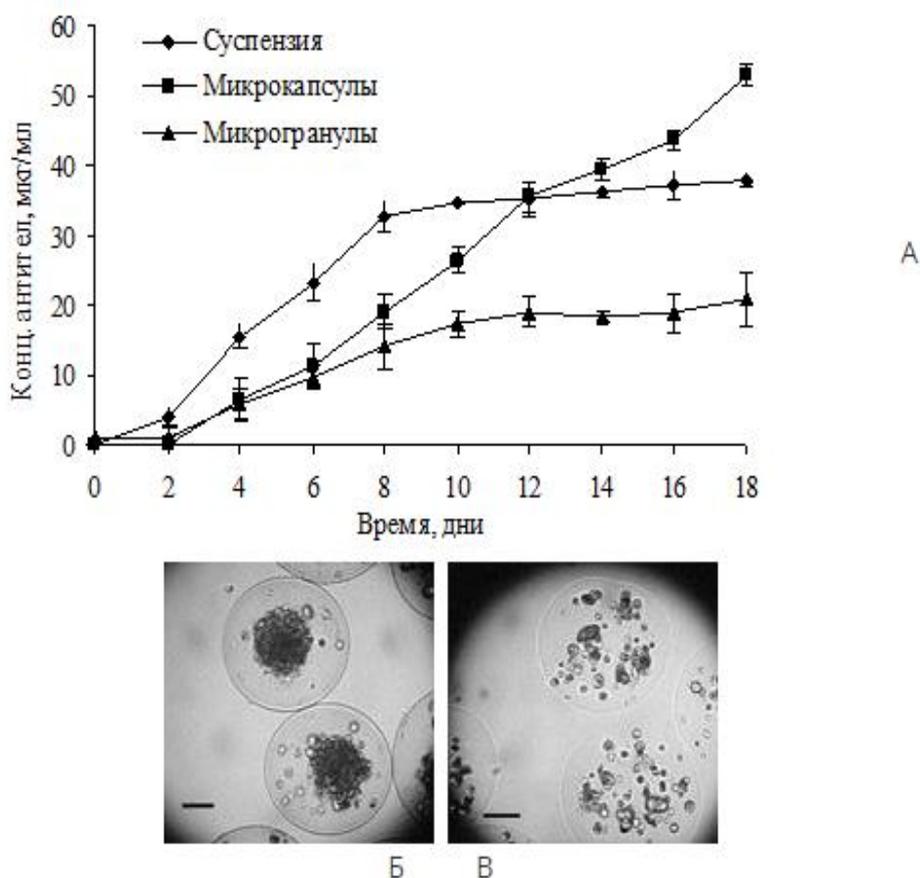


Рис. 15. Культивирование СНО L2 в микрокапсулах, микрогранулах и суспензионной культуре
Примечание: А – продукция антител; Б – изображения клеток на 14 день культивирования, растущих в CaAlg микрогранулах; В – в альгинат-олигохитозановых микрокапсулах. Шкала 100 мкм
<https://s.science-education.ru/pdf/2011/5/84.pdf>

Документы, регламентирующие деятельность предприятий

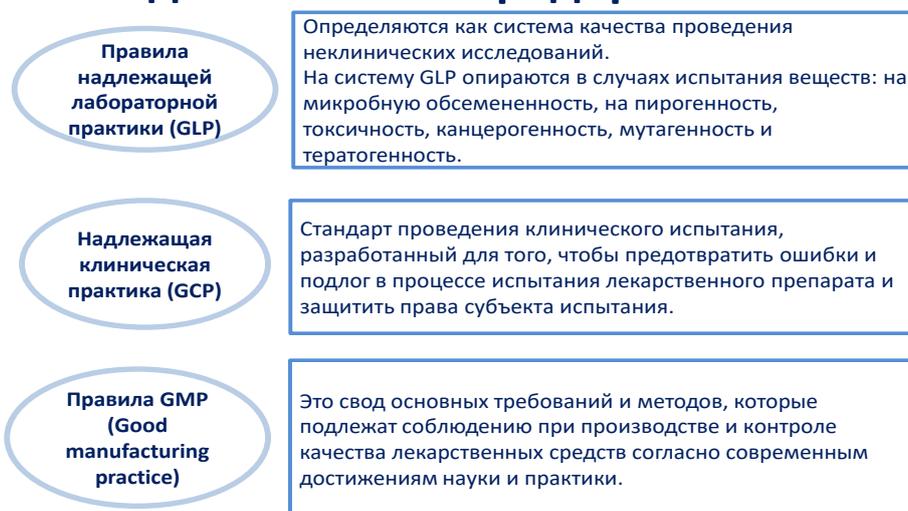


Рис. 16. Документы, регламентирующие деятельность БТ-предприятий

Сортировка и утилизация отходов



Рис. 17. Сортировка и утилизация отходов биотехнологического производства

Общие требования к сбору, обеззараживанию и хранению отходов

- специальные промаркированные контейнеры (герметичные, влагонепроницаемые);
- жидкие отходы: термическое или химическое обезвреживание;
- твердые и биологические отходы вивария: термическое обезвреживание;
- учетывание антигенных особенностей;
- исключение сенсibiliзирующего действия (возникновения аллергических заболеваний);
- грубое разделение плотных и жидких отходов → отжим влаги с последующей передачей уплотненной биомассы клеткам на обезвреживание;
- плотные отходы растительного или животного происхождения: токсичные сжигают, не токсичные - отправляют на утилизацию.

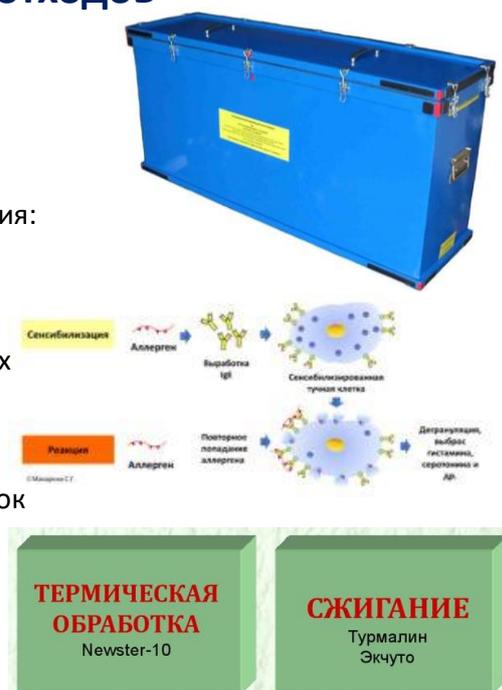


Рис. 18. Общие требования к сбору, обеззараживанию и хранению отходов биотехнологического производства

ЛЕКЦИЯ 7

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ И КЛЕТКИ, ПРЕИМУЩЕСТВА ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ И КЛЕТОК В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ

Ферменты представляют собой преимущественно сложные соединения белковой природы, либо их комплексы, выступающих катализаторами для ускорения химических реакций. Ферменты, как и большинство белков, синтезируются в клетке путем биосинтеза на рибосомах. Важность ферментов заключается в их роли в клетке и организме в целом за счет регуляции большинства биохимических реакций метаболических путей.

Все ферментативные реакции, катализируемые ферментами, можно разделить на несколько классов:

- окислительно-восстановительные реакции;
- перенос различных функциональных групп от одних молекул на другие;
- гидролитические реакции;
- разрыв внутримолекулярных связей;
- внутримолекулярные перестройки;
- реакции, протекающие с затратами энергии.

Все ферменты обладают свойством осуществлять катализ специфических реакций за счет своего сложного молекулярного строения. В настоящее время известно несколько тысяч специфических ферментов, однако их применение в практике осложняется рядом ограничений:

- лабильность (неустойчивость) ферментов при хранении и использовании в свободном виде;
- невозможность многократного использования ферментов из-за сложности отделения продуктов биохимической реакции и субстратов;
- трудность получения фермента из исходного агента и его очистка от других компонентов.

Иммобилизованные ферменты

Эти ограничения приводят к большим трудозатратам при получении ферментов, что в итоге отражается на высокой стоимости их производства. Развитие инженерной энзимологии привело к появлению в

60-х годах XX в. технологий иммобилизации ферментов, позволяющих решить эти проблемы.

Иммобилизация фермента – это локализация фермента в фазу (матрица/носитель), отличную от фазы для субстратов и продуктов. В качестве несущих матриц обычно используются инертные полимеры и неорганические материалы. Помимо того, что идеальная матрица является доступной, она должна включать такие характеристики, как инертность, физическую прочность, стабильность, регенерируемость, способность увеличивать специфичность/активность фермента и снижать ингибирование продукта, неспецифическую адсорбцию и микробное загрязнение. Иммобилизация обеспечивает непрерывность экономических операций, автоматизацию, высокий коэффициент инвестиций/мощности и восстановление продукта с большей чистотой. Для иммобилизации используется несколько методов, при этом различные факторы оказывают влияние на эффективность иммобилизованных ферментов (табл. 3).

Таблица 3

Факторы, влияющие на эффективность иммобилизованных ферментов

Факторы	Эффект иммобилизации
Гидрофобное разделение	Повышение скорости реакции гидрофобного субстрата
Микросреда носителя	Гидрофобная среда стабилизирует фермент
Многоточечное крепление носителя	Повышение термической стабильности фермента
Спейсеры различных типов иммобилизованных ферментов	Предотвращают дезактивацию фермента
Ограничение диффузии	Активность фермента снижается, а стабильность повышается.
Наличие субстратов или ингибиторов	Сохранение более высокой активности
Физическая пост-обработка	Улучшение работы ферментов
Физическая природа и структура носителя	Носители с большим размером пор уменьшают диффузию, что приводит к более высокому сохранению активности

Стабилизация ферментов, особенно тех, которые используются в промышленном производстве, зависит от конкретных знаний, исследований и применения. При определенных условиях, как в водной, так

и в неводной (органической) среде структура ферментов может подвергаться денатурации. Чрезвычайно кислые и/или щелочные среды, реакции, происходящие при очень высоких или низких температурах, растворы с высокой ионной силой, повышенные концентрации поверхностно-активных веществ, наличие или отсутствие солей металлов могут сильно влиять на структуру и, следовательно, активность ферментов.

Методы иммобилизации

Существуют различные методы иммобилизации ферментов. Наиболее распространены три метода иммобилизации ферментов: адсорбция, захват или инкапсулирование и сшивание или ковалентное связывание с носителем (рис. 19). Независимо от метода иммобилизации материал, в котором иммобилизован фермент, должен быть нерастворим в растворителе, которым наиболее часто является вода. Метод адсорбции включает физическую адсорбцию фермента на основу или опорный материал, часто на полимерную матрицу (например, полимерные шарики или мембраны). Этот метод относительно прост, поскольку он обычно включает либо погружение носителя в раствор фермента и инкубацию, чтобы дать время для физической адсорбции на поверхность, либо предоставление раствору фермента высохнуть на поверхности электрода, с последующим вымыванием фермента, который не адсорбируется. Данный метод трудоемок, так как позволяет выщелачивать фермент в процессе реакции, тем самым загрязняя субстрат. Физическая адсорбция также может денатурировать фермент в зависимости от химического состава поверхности материала носителя.

Метод захвата/инкапсулирования включает захват фермента либо в решетчатую структуру материала, либо в полимерные мембраны. Обычно это сводит к минимуму выщелачивание фермента и улучшает стабилизацию, но часто приводит к ограничению транспорта субстрата/аналита к активному центру фермента. Однако, этот метод позволяет адаптировать инкапсулирующий материал для обеспечения оптимальной микросреды для фермента (т.е. соответствия физико-химической среде фермента и иммобилизационного материала). Такая идеальная микросреда создается оптимальным значением рН, полярностью или амфифильностью. Этого можно достигнуть с помощью различных материалов, включая: полимеры, золь-гели, композиты полимер/золь-гель и другие неорганические материалы. Кроме того, фер-

менты также могут быть иммобилизованы за счет перекрестного связывания белков с нерастворимым носителем, чтобы предотвратить потерю фермента в растворе субстрата.

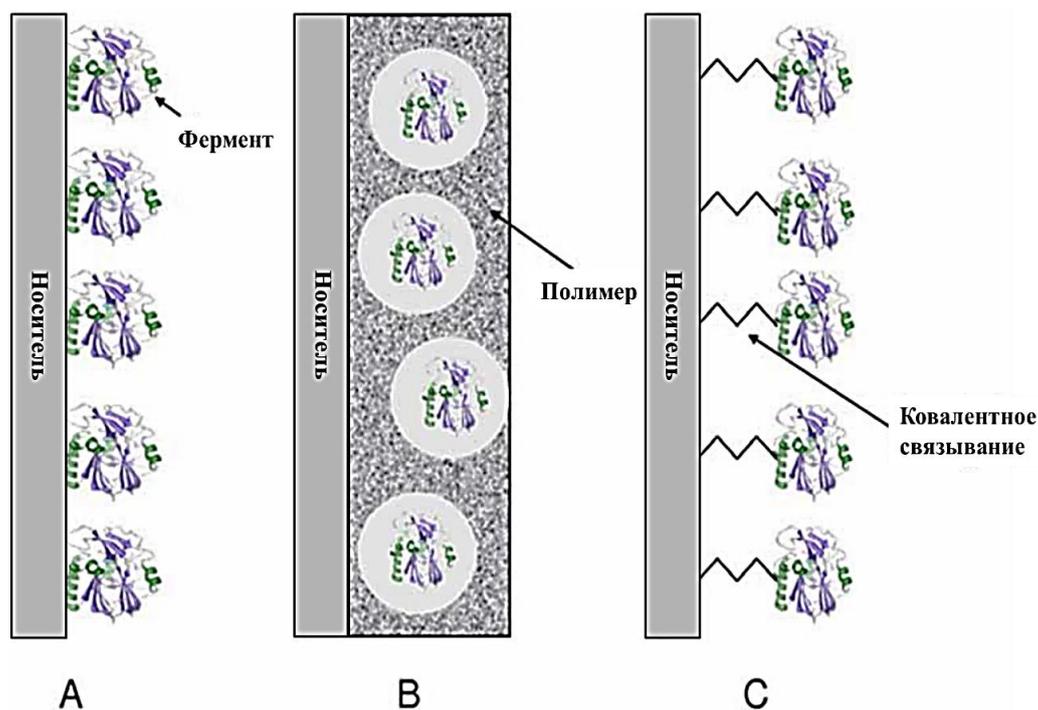


Рис. 19. Методы иммобилизации ферментов:
 А – физическая адсорбция, В – захват/инкапсулирование,
 С – ковалентное связывание

Третьим распространенным методом связывания является ковалентное связывание фермента с носителем/подложкой. Ковалентное связывание ферментов с носителями происходит благодаря аминокислотам их боковых цепей, таких как аргинин, аспарагиновая кислота, гистидин, и степени реактивности, основанной на различных функциональных группах, таких как имидазол, индол, фенольный гидроксил и т.д. Однако, сшивание или ковалентное связывание фермента с поверхностью материала подложки обычно снижает степень подвижности фермента, что может резко снизить его активность.

Методы адсорбции используют водорастворимые носители, такие как производные полисахаридов, синтетические полимеры и стекло. Такие полимеры, как коллаген, целлюлоза и κ-каррагенан, применяются для инкапсулирования, в то время как метод мембранной локализации включает в себя рецептуру липосом и микрокапсул. При ковалентном связывании используются би/многофункциональные реагенты, такие как глутаральдегид, бисдиазобензидин и гексаметилендиизоцианат.

Иммобилизованные клетки

По сравнению с иммобилизованными ферментами иммобилизованные клетки открывают новые возможности, поскольку они могут использоваться в качестве естественных нерастворимых в воде носителей необходимой ферментной активности. Очевидные экономические преимущества подчеркиваются относительно простой технологией приготовления иммобилизованных клеток и тем фактом, что некоторые ферменты проявляют наибольшую активность, когда физиологически связаны с клеточными структурами, такими как плазмалемма, клеточная стенка, субклеточные структуры и цитоплазма. способность иммобилизованных клеток и внутриклеточных органелл сохранять частичные или целые последовательности метаболических реакций после мягкой и надлежащим образом выбранной иммобилизации позволяет использовать микроорганизмы; растительный или животный целис в качестве биокатализаторов в контролируемом синтезе ряда промышленных соединений, таких как гормоны, алкалоиды и ферменты.

Принципы иммобилизации клеток, как правило, можно разделить на физические, физико-химические и химические, в зависимости от того, прикреплены ли клетки к носителю или друг к другу, и является ли связывание ферментов в клетках опосредованным путем физического воздействия (например, силы Ван дер Ваальса между неполярными молекулами) или физико-химического (например, полярные) взаимодействия, или посредством координационных и ковалентных связей. Исходя из метода, иммобилизация клеток может быть разделена на фиксацию ферментов в отдельных клетках или агрегатах клеток, захват клеток в различных гелях или в формирующей полимерной сети, инкапсуляцию клеточной суспензии, ионную связь клеток на различных ионных обменниках, иммобилизация клеток на различных синтетических или природных, органических или неорганических материалах и взаимное связывание клеток без водорастворимого носителя.

Препараты иммобилизованных клеток могут оцениваться в соответствии с их биохимическими, физическими, физико-химическими, и особенно технологическими и экономическими критериями. Специфическая активность служит первичным биохимическим критерием наряду со скоростью и эффективностью преобразования субстратов в соответствующие продукты, сродством иммобилизованного матери-

ала к субстрату, степени ингибирования ферментной активности субстратами или продуктами реакции (постоянное, конкурентное или неконкурентное ингибирование). Физические критерии включают размер или распределение частиц по размерам, форму, скорость осаждения, механическую устойчивость и гидродинамические свойства. Оптимальное (рабочее) значение рН, стабильность ферментной активности по отношению к рН и температуре, а также влияние диффузии на скорость реакции в препаратах иммобилизованных клеток служат физико-химическими критериями.

Технологические и экономические критерии включают простоту и количество операций при подготовке катализаторов для клеток; выход иммобилизации, стабильность при хранении, универсальность использования в определенном типе реактора, затраты на сырье и зависимость от импорта, требования к оборудованию и т.д.

Преимущества иммобилизации ферментов и клеток:

- 1) многократность применения ферментов и живых клеток;
- 2) уменьшение количества отходов производства;
- 3) повышение качества целевого продукта, за счет отсутствия белков, способных вызывать аллергические реакции, снижение пирогенности;
- 4) большой выход целевого продукта;
- 5) стандартизация биотехнологического процесса;
- 6) более высокая устойчивость к внешним воздействиям.

Методы иммобилизации имеют и свои ограничения. В первую очередь они связаны с невозможностью выхода продукта ферментативной реакции в среду растворителя и накоплением его внутри клетки. Другим не менее важным ограничением является невозможность иммобилизации фермента, имеющего кофермент, который имеет не прочную связь с ферментом. Эти условия приводят к тому, что такие ферменты не используются в создании биореакторов.

Применение иммобилизованных ферментов и клеток

Традиционно ферменты используются в реакциях, проводимых либо в реакторе периодического действия, либо в варианте проточного реактора непрерывного действия. Реакторы периодического действия применимы для производства меньшего масштаба из-за того, что они требуют больше труда и времени, чем реактор непрерывного действия, но их выгодно использовать с дорогими ферментами из-за того, что они легко содержат небольшие количества фермента и не являются расточительными. Использование проточного реактора выгодно тем,

что позволяет увеличить время реакции, а также эффективность реакции с использованием биокатализатора. При этом в зависимости от применения возможны различные варианты и комбинации реакторов периодического и непрерывного действия.

Промышленное применение иммобилизованных ферментов не вызывает затруднений; они обеспечивают многократные методы производства химических веществ посредством биокатализируемых реакций. Наряду с получением желаемых соединений иммобилизованные ферменты также обладают способностью расщеплять вредные или нежелательные соединения, что обеспечивает дополнительную область применения по очистке сточных вод. Медицина также выиграла от иммобилизации ферментов. Иммобилизованные ферменты оказались ценными для многих приложений, включая системы доставки лекарств и идентификацию опухолей, а также в сенсорах в различных приборах для контроля уровня глюкозы при сахарном диабете (иммобилизованный фермент глюкозооксидаза).

Энантиомеры, или молекулы, которые являются стереоизомерами, в настоящее время являются источником проблем в таких отраслях, как фармацевтика. Соединения, используемые в природе, обычно синтезируются в виде определенных стереоизомеров, например, L-аминокислоты или D-сахара, которые затем могут быть принимать участие в биохимических реакциях. Однако, химические вещества, синтезированные в лаборатории, обычно образуют рацемические смеси, включающие оба типа изомеров.

Примером может служить разделение смеси рацематов L- и D-аминокислот. Поскольку в человеческом организме усваиваются только L-аминокислоты, то их D-стереоизомеры не представляют ценности в фармацевтике. Для решения этой проблемы был разработан метод разделения изомеров с использованием фермента аминоксилазы иммобилизованного на ДЭАЭ-целлюлозе. Принцип метода основан на избирательной способности отсоединения от ацил-L-изомера ацильного радикала с высвобождением свободной L-аминокислоты, обладающей большей растворимостью, в отличие от ацил-D-изомера, не вступающего в реакцию. После этого стереоизомеры легко разделяются друг от друга.

Важным примером применения иммобилизованных клеток служит технология получения 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК), являющейся предшественником широкого ряда антибиоти-

ков. Природным сырьем 6-АПК является бензилпенициллин, содержащий весьма лабильное беталактамное кольцо, которое необходимо подвергнуть реакции деацитилирования. Проведение такой реакции в простых химических условиях очень трудоемкий процесс с низким выходом конечного продукта (около 1%). Для решения этой проблемы был применен метод иммобилизации культуры *E. coli*, содержащей фермент пенициллинамидазу в геле. Этот фермент катализирует реакцию по расщеплению амидной связи, которая необходима для образования 6-АПК. В результате удалось достичь выхода целевого продукта (до 80%) в промышленных масштабах с наименьшими затратами.

Ярким примером применения иммобилизованных ферментов стала разработка метода ELISA, нашедшего широкое применение в медицине как метода качественного или количественного определения различных низкомолекулярных соединений, макромолекул, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело с последующей иммобилизацией фермента на поверхности комплекса (например, пероксидазы хрена) и добавлением субстрата фермента с последующей детекцией результата по изменению цвета.

РАЗДЕЛ 2

БИОТЕХНОЛОГИЯ БЕЛКОВ

ЛЕКЦИЯ 8

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ БЕЛКОВОЙ ЭКСПРЕССИИ

Иммуноферментный анализ (сокращённо ИФА, англ. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) – лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных низкомолекулярных соединений, макромолекул, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело. Выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием фермента в качестве метки для регистрации сигнала.

Достоинства ИФА:

- 1) уникальная специфичность иммунохимической реакции (то есть антитела связываются исключительно с определёнными антигенами, и ни с какими другими);
- 2) высокой чувствительностью детекции ферментативной метки (вплоть до 10^{-21} моль в образце);
- 3) высокая стабильность реагентов;
- 4) простота методов регистрации (спектрофотометрическая или хемилюминесцентная детекция), простота оборудования в целом;
- 5) возможность создания каскадных систем усиления различных химических сигналов;
- 6) большой выбор коммерческих наборов, привлекательная цена.

Из-за разнообразия объектов исследования – от низкомолекулярных соединений, пептидных и стероидных гормонов, фармакологических препаратов, пестицидов, до вирусов и бактерий, и даже до других антител, – многообразия принципов связывания и многообразия условий проведения ИФА существует большое количество вариантов этого метода. По одним лишь вариантам регистрации ферментативной активности возможно применение фотометрических, флуориметрических, био- и хемилюминесцентных методов, что лежит в **основе классификации ИФА**.

Возможна классификация ИФА по типу иммунохимического взаимодействия на первой стадии анализа (в которой происходит связывание определяемого вещества). Если в системе присутствуют только анализируемое соединение и соответствующие ему центры связывания (антиген и специфические антитела), то метод является неконкурентным. Если же на первой стадии в системе одновременно присутствует анализируемое соединение и его аналог (меченное ферментом анализируемое соединение или анализируемое соединение, иммобилизованное на твердой фазе), конкурирующие за ограниченное количество центров специфического связывания, то метод является конкурентным.

Примером неконкурентного формата ИФА является «сэндвич»-метод (рис. 20). К носителю с иммобилизованными антителами добавляют раствор, содержащий анализируемый антиген. В процессе инкубации на первой стадии на твердой фазе образуется комплекс антиген-антитело. Затем носитель отмывают от несвязавшихся компонентов и добавляют меченные ферментом специфические антитела. После второй инкубации и удаления избытка конъюгата антител с ферментом определяют ферментативную активность носителя, которая пропорциональна начальной концентрации исследуемого антигена. На стадии выявления специфического иммунокомплекса антиген оказывается, как бы зажатым между молекулами иммобилизованных и меченных антител, что послужило поводом для широкого распространения названия «сэндвич»-метод. Ферментативная реакция (цветная реакция) проходит в присутствии перекиси водорода и субстрата, представленного неокрашенным соединением, которое в процессе пероксидазной реакции окисляется до окрашенного продукта реакции на заключительном этапе проведения исследования. Интенсивность окрашивания зависит от количества выявленных специфических антител. Результат оценивается спектрофотометрически или визуально.

Ферменты, используемые в ИФА в качестве меток

К выбору ферментных меток в ИФА предъявляется ряд общих требований. Основными являются следующие:

- 1) высокая специфичность и удельная каталитическая активность, позволяющая обнаружить метку в низких концентрациях;
- 2) доступность фермента, возможность получения достаточно чистых ферментных препаратов, сохраняющих высокую активность после химической модификации при получении конъюгата с антигенами или антителами;

3) стабильность в оптимальных условиях взаимодействия антигена с антителом;

4) простота и чувствительность метода определения концентрации фермента.

Иммобилизованные
моноклональные
антитела

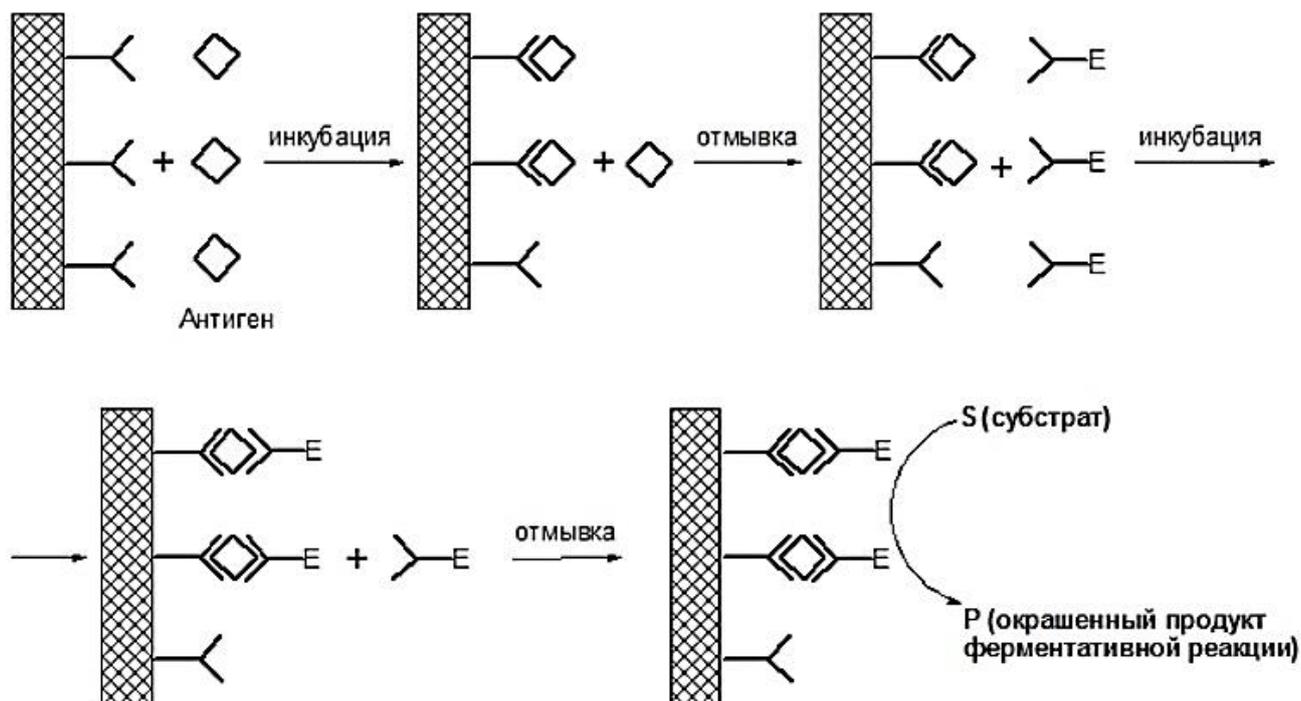


Рис. 20. Сэндвич-метод

(http://elar.ssmu.ru/bitstream/20.500.12701/1581/1/tut_ssmu-2021-24.pdf)

Наибольшее распространение в гетерогенном ИФА (где используются реагенты, иммобилизованные на поверхности твёрдых носителей) получили пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза и β -D-га-лактозидаза. Наиболее доступной является пероксидаза хрена. Она содержит легко окисляемые перйодатом углеводные остатки, через которые может осуществляться связывание фермента с антителами или антигенами. В качестве субстратного реагента наиболее часто применяется орто-фенилендиамин или тетраметилбензидин (ТМБ) с перекисью водорода, продукт окисления которых регистрируется фотометрически. Для остановки ферментативной реакции применяют «стоп реагент», который добавляют во все исследуемые и контрольные пробы в равных количествах. Наиболее часто в качестве «стоп реагента» применяют серную кислоту. Учёт результатов проводят спектрофотометрически при длине волны 450–490 нм.

Оборудование и расходные материалы для ИФА:

- 1) иммунологический планшет с сорбированными антителами к АГ;
- 2) ИФА-анализатор;
- 3) промыватель планшет.

Представление результатов ИФА как преимущественно количественного метода возможно в виде таблиц, графиков, диаграмм. Спектр биологических жидкостей для ИФА – сыворотка/плазма крови, слюна, спинномозговая жидкость, экссудаты, супернатанты тканей. Основное требование – сохранность четвертичной структуры белка.

Основные ошибки при проведении ИФА:

- 1) несоблюдение температурного и временного режима,
- 2) многоразовая пластиковая посуда,
- 3) повторное замораживание-размораживание проб,
- 4) неправильные промывки,
- 5) неправильное построение калибровочной кривой,
- 6) если уровень маркера в пробе не попадает в калибровку, его нужно развести и переделать.

Ложноположительные результаты при определении антител к различным инфекциям методом ИФА могут возникнуть за счёт ревматоидного фактора, представляющего собой иммуноглобулин М против собственных иммуноглобулинов G человека; за счёт антител, образующихся при различных системных заболеваниях, нарушениях обмена или приёме лекарственных препаратов; у новорождённых такие ложноположительные реакции могут возникать за счёт образования в организме ребёнка М-антител к иммуноглобулину G матери. Помимо этого, причиной ложноположительных результатов может быть синдром поликлональной активации. При этом, особые вещества – суперантигены – неспецифически стимулируют выработку В-лимфоцитами антител к различным инфекциям. Практически это выражается в неспецифическом нарастании титра антител сразу ко многим возбудителям. Ложноотрицательные результаты при определении антител могут быть обусловлены состояниями иммунодефицита.

Вестерн блоттинг (WB) – аналитический метод, используемый для определения специфичных белков в образце.

На 1-ом этапе (пробоподготовка и электрофорез белков) для разделения смеси белков, используется 1D-электрофорез в полиакриламидном геле по Lemmli.

На 2-ом этапе (собственно блоттинг) под действием капиллярных сил происходит перенос белков с геля на нитроцеллюлозную или PVDF мембрану.

На 3-ем этапе проводят блокирование неспецифического связывания, что достигается помещением мембраны в разбавленный раствор нежирного сухого молока с детергентами или добавление коммерческих растворов (Ibind solution, например).

4-й этап – окрашивание мембраны специфическими антителами, отмывка.

5-й этап – окрашивание мембраны вторичными антивидовыми конъюгированными антителами.

6-й этап – детекция целевого белка.

При использовании 1D-электрофореза белков в полиакриламидном геле по Лемли обычно исходят из следующих допущений:

- белки после обработки SDS находятся в полностью денатурированном состоянии;

- количество молекул SDS, связанных с полипептидом, пропорционально его длине, и, следовательно, молекулярной массе;

- собственный заряд полипептида несущественен в сравнении с зарядом связанного с ним SDS. Вместе с образцами на гель наносят белок-маркер молекулярной массы.

Наиболее часто используют хемилюминесцентную систему детекции (рис. 21).

WB – метод полуколичественный! Проводится перерасчет на актин (структурный белок, до 20% от всех белков в клетке) и часто на норму, неизмененную ткань т.д., уровень детектируемого белка определяется в % от нормы, неизмененной ткани, усредненной ткани, иногда результаты описываются как для иммуногистохимии (-/+/++/+++). Результаты представляют в виде блотов по данным денситометрии.

Оборудование для вестерна блоттинга представлено держателями для заливки геля, стеклами разного формата, системой для проведения электрофореза и переноса белков, различные устройства для оптимизации мануального блоттинга на этапах окрашивания первичными и вторичными антителами, системы визуализации (например, с для детекции хемилюминесценции и колориметрии гелей). Оборудование представлено на рисунке 22.

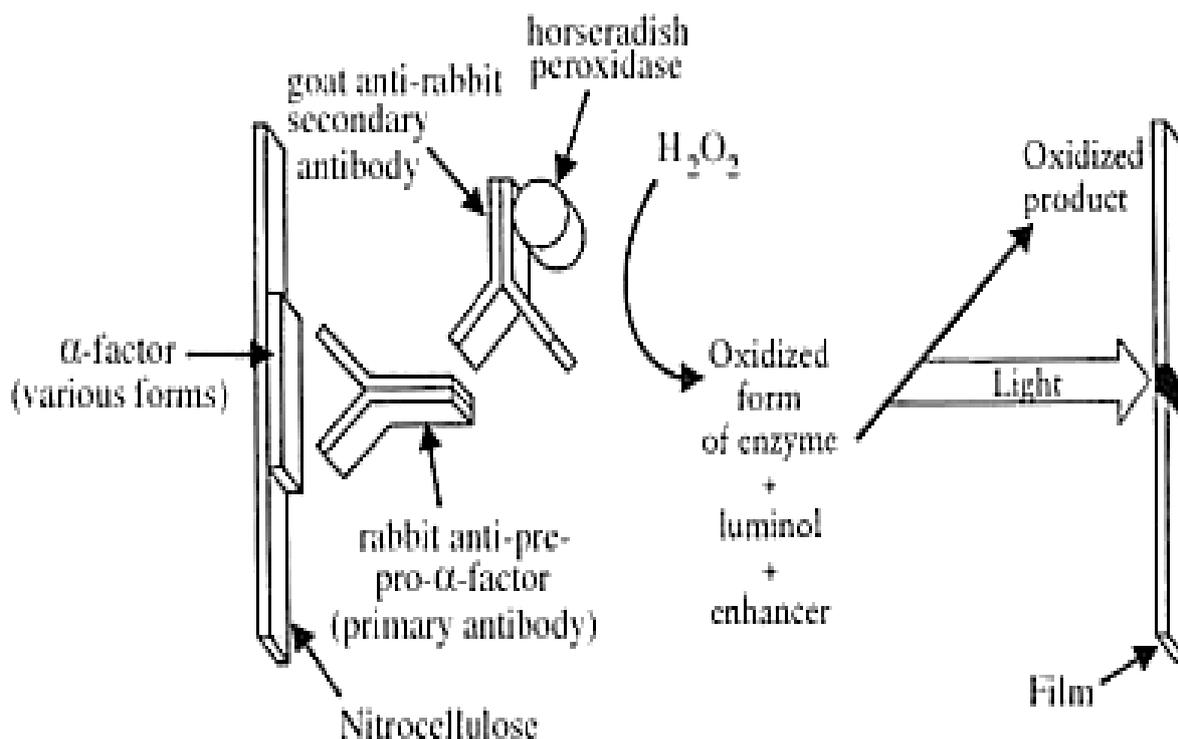


Рис. 21. Хемилюминесцентная система детекции в Вестерн блоттинге

Примечание. Peroxidaza хрена катализирует окисление люминола в 3-ами-ноф-талат через серию интермедиатов. Данная реакция сопровождается свечением низкой интенсивности с длиной волны 428 нм. В присутствии некоторых веществ, возможно достичь усиления свечения до тысячи раз. Явление усиления свечения называют усилением хемилюминесценции (англ. enhanced chemiluminescence, ECL)

(<https://slide-share.ru/metodi-ocenki-belkovoij-ehkspressii-ifa-analiz-vestern-blotting-279543>)

Иммунопреципитация – метод выделения белка из сложных смесей, таких как клеточные лизаты, сыворотки, тканевые гомогенаты с помощью специфических к белку антител, сорбированных на гранулах (микрогранулы агарозы, латекса, магнитные микрогранулы).

Ко-иммунопреципитация – это иммунопреципитация целого белкового комплекса, которая основана на использовании антитела, специфичного к одному из белков, входящих в состав комплекса. Связывая этот белок, антитело связывает весь комплекс. В результате появляется возможность идентифицировать все белки, входящие в состав комплекса. Иммунопреципитация часто дополняется Вестерн блоттингом или ИФА-анализом.

STAIN-FREE
ENABLED

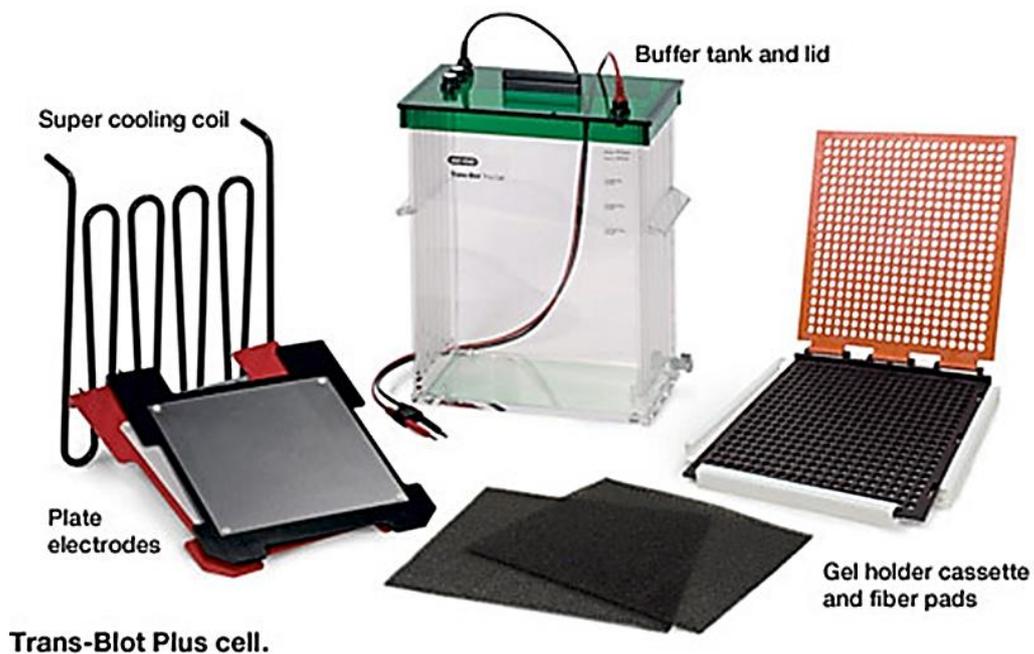


Рис. 22. Оборудование для Вестерн блоттинга
(<https://slide-share.ru/metodi-ocenki-belkovoij-ehkspressii-ifa-analiz-vestern-blotting-279543>)

РАЗДЕЛ 3

КЛЕТОЧНЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ

ЛЕКЦИЯ 9

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ И ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ КЛЕТОК: ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИЯ, ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ, КЛЕТОЧНЫЙ СОРТИНГ, ИММУНОЦИТОХИМИЯ

Иммунофенотипирование – характеристика клеток при помощи моноклональных антител или каких-либо других зондов, позволяющих судить об их типе и функциональном состоянии по наличию того или иного набора клеточных маркеров. Для идентификации и исследования поверхностных клеточных маркеров в 1982 г. была предложена номенклатура дифференцировочных антигенов, так называемых кластеров дифференцировки (англ. cluster of differentiation antigens (CD) – маркеров, отличающие одни типы клеток от других. Дифференциации этих антигенов изучены и стандартизованы, им присвоены определенные номера. Список CD-антигенов, внесённых в номенклатуру, постоянно пополняется и в настоящее время содержит 371 CD-антигенов и их подтипов. CD могут быть распознаны с помощью соответствующих моноклональных антител.

Иммунофенотипирование – важный исследовательский и диагностический метод анализа клеток крови, костного мозга, лимфоузлов и т.д. Он используется при диагностике ряда злокачественных, аутоиммунных, наследственных и инфекционных заболеваний, но в гематологии особенно существенна его роль в точной диагностике лейкозов и лимфом. Иммунофенотипирование позволяет определить вид опухолевых клеток и степень их зрелости, тем самым идентифицируя конкретный вариант болезни.

Визуализация живых клеток

Благодаря растущему числу исследований, использующих методы визуализации живых клеток, и стремительным успехам в области технологии флуоресцентных белков и синтетических флуорофоров, складывается принципиальное понимание природы функционирования клеток и тканей. По существу, визуализация живых клеток стала не

только необходимым инструментом в большинстве биологических лабораторий, занимающихся изучением клеток, но и стандартной методикой, применяющейся в различных областях нейробиологии, биологии развития, фармакологии и других биомедицинских дисциплинах. На рисунке 23 представлена серия изображений независимых клеточных линий, каждая из которых окрашена отдельной комбинацией синтетических флуорофоров и/или флуоресцентных белков.

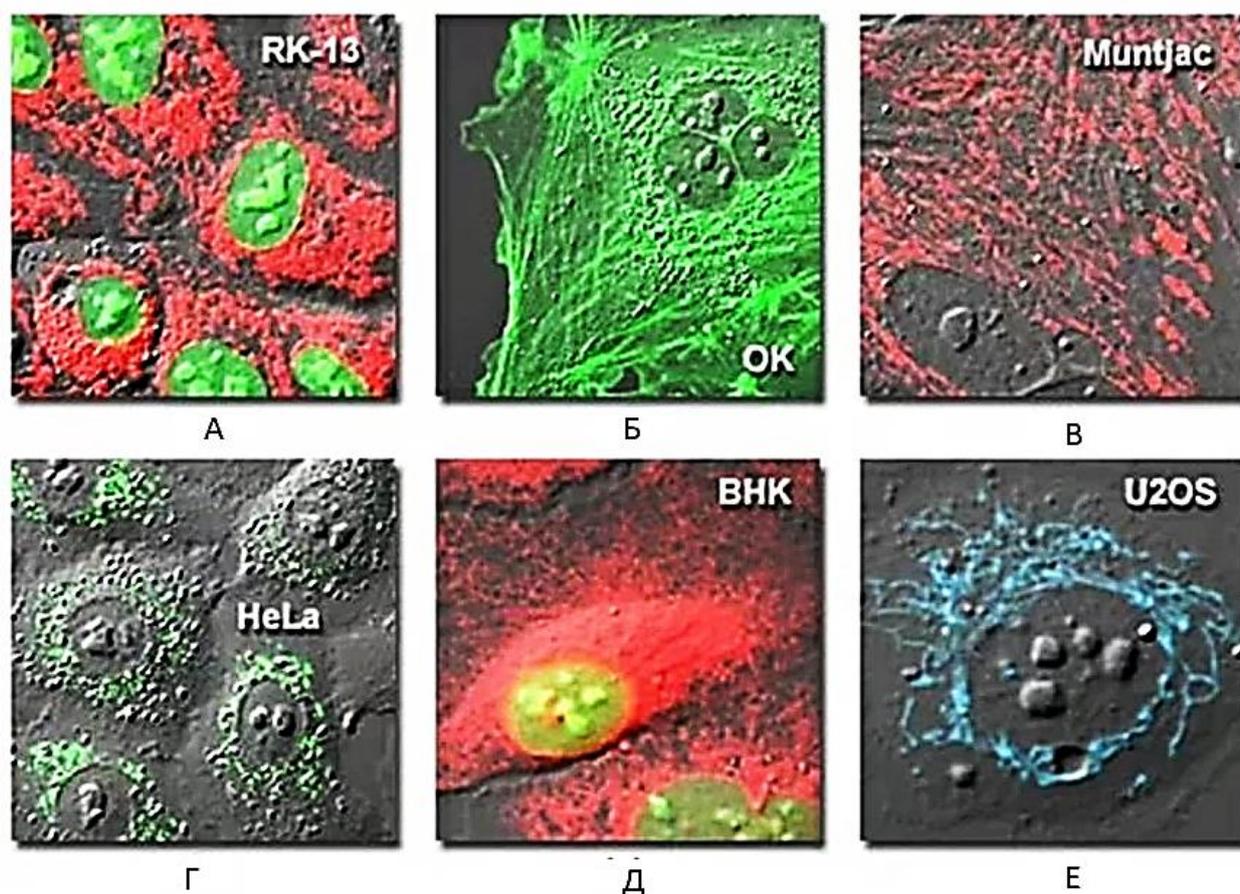


Рис. 23. Визуализация живых клеток при помощи флуоресцентных белков и ДИК (дифференциальная интерференционно-контрастная микроскопия)
Примечание: А-эпителиальные клетки почки кролика (линия RK-13) были трансфицированы гибридной плазмидой усовершенствованного желтого флуоресцентного белка (EYFP) и сигнальным ядерным пептидом, с целью локализации зеленовато-желтой метки внутри ядер. Затем, с целью окраски митохондрий, клетки были обработаны митохондриальным красителем MitoTracker Red CMXRos. На рисунке **23Б** представлены проксимальные цилиндрические эпителиальные клетки почки опоссума (линия ОК), трансфицированные вектором внутриклеточной локализации EYFP-актина, с целью мечения филаментного актина цитоскелетной сети. На рисунке **23В** представлены митохондрии клеток индийского мунтжака, трансфицированные фузионным вектором DsRed2, а на рисунке **23Г** показаны пероксисомы клеток цервикальной карциномы человека

(линия HeLa), помеченные EGFP-пероксисомальной рекомбинантной (химерической) плазмидой. На рисунке 23Д представлена адгезивная культура нормальных клеток фибробласта почки сирийского золотистого хомячка (линия ВНК-21), трансфицированных смесью DsRed2 FP-эндоплазматической сети и векторами внутриклеточной локализации EGFP-ядер, и полученная в результате локализация ядерной зеленой флуоресцентной белковой метки и оранжево-красного зонда для эндоплазматической сети. На рисунке 23Е представлены клетки костной остеосаркомы человека (линия U2OS), трансфицированные лазурным флуоресцентным белком, слитым с митохондриальной последовательностью-мишенью с целью подсвечивания митохондрий. Каждое, из представленных на рис. 23, изображений регистрировалось в отдельном канале по методу дифференциально-интерференционного контраста и накладывалось на флуоресцентный канал (каналы) с целью определения границ клеток и иных общих структурных особенностей, например, ядер (https://stormoff.ru/mediacenter/articles/article_76/)

В живых клетках флуоресцентные белки обычно используются для наблюдения местоположения и динамики белков, органелл и других клеточных компартментов. Основным средством доставки химерных генетических последовательностей флуоресцентных белков в клетки являются бактериальные плазмиды и вирусные векторы, полученные методами генной инженерии. Гены флуоресцентных белков могут быть введены в клетки млекопитающих и другие клетки с помощью соответствующих временных или стабильных векторов (обычно это или вирусы). В экспериментах по временной экспрессии генов (часто называемых временной трансфекцией) ДНК плазмид или вирусов, введенных в организм-хозяин, не обязательно сливаются с хромосомами, но могут экспрессироваться в цитоплазме в течении короткого периода времени. Экспрессия слитых (гибридных) генов, легко отслеживаемая по флуоресцентному свечению с помощью фильтрационных блоков, соответствующих данному флуоресцентному белку, начинается в течении нескольких часов после трансфекции и продолжается от 72 до 96 ч после введения ДНК плазмид в клетки млекопитающих. Во многих случаях ДНК плазмид могут быть введены в геном устойчивым образом, что порождает стабильные трансформированные клеточные линии. Выбор между временной и стабильной трансфекцией зависит от объектов-мишеней в данном эксперименте.

При разработке планов по наблюдению живых клеток и длительных экспериментов по получению изображений необходимо очень серьезно отнестись к ряду важных факторов. Для четкой визуализации

интересующих исследователя биологических компонентов необходимо правильно окрасить образец соответствующим флуоресцентным белком или синтетическим флуорофором. Возможно, даже более важным аспектом является содержание клеточной культуры в условиях, способствующих ее росту и нормальному функционированию, с тем, чтобы исключить потенциальные искажения в интерпретации результатов эксперимента. Кроме того, методика визуализации клеток должна обеспечивать достаточное пространственное и временное разрешение, не вызывать фототоксичность и не влиять на локализацию флуоресцентных зондов. Среди наиболее важных стандартных аспектов визуализации живых клеток необходимо отметить температуру, насыщенность кислородом, влажность, осмолярность, рН (буферизацию среды), фототоксичность, лабораторные условия, дрейф фокусировки микроскопа, интенсивность флуоресцентного сигнала, проступание и разрешение.

Выбор клеточных линий для получения изображений живых клеток

Выбор клеточных линий для получения изображений живых клеток часто определяется (и ограничивается) рядом факторов, включая целевые наблюдения исследования, способность клеток окрашиваться синтетическими флуорофорами, эффективность трансфекции, а также способность конкретной линии клеток переносить жесткие окружающие условия культуральной камеры и освещение. Очень часто клеточная линия, демонстрирующая превосходные свойства в одной или в нескольких из упомянутых категорий, в другой работает очень слабо, либо не функционирует полностью. Например, с целью исключительно точного выявления сложных деталей клеточной структуры, нормальные эндотелиальные клетки легочной артерии быка (линия ВРАЕ) можно связывать и окрашивать синтетическими флуорофорами. Однако, эта линия допускает трансфекцию векторами флуоресцентного белка только с низкой эффективностью (менее 5%) и сравнительно плохо переносит длительное освещение с низкими уровнями интенсивности, которое никак не влияет на многие другие клеточные линии. И наоборот, эпителиальные клетки почки кролика (линия RK-13) с высокой эффективностью трансфецируются различными плазмидами и очень устойчивы к высоким уровням освещения (включая лазерное излучение) в процессе повторяющихся на протяжении нескольких дней последовательностей получения изображений в течение

заданного времени, но не окрашиваются в достаточной степени популярными флуорофорами (например, MitoTrackers), предназначенными для визуализации живых клеток.

Решающим фактором успешного наблюдения биологических процессов в живых клетках является наличие у выбранной для исследования и получения изображений клеточной линии необходимых морфологических и физиологических свойств, позволяющих определенно выявить интересующие исследователя аспекты. В исследованиях, направленных, например, на митоз, многие клеточные линии мало пригодны для получения изображений, из-за того, что делящиеся клетки приобретают сферическую форму и могут отделяться от субстрата. Напротив, клетки, остающиеся в процессе митоза плоскими и соединенными с субстратом, превосходно подходят для выявления тончайших деталей митотического веретена во время деления клеток. Среди наиболее пригодных для исследований митоза клеточных линий отметим клетки почки кенгуровой крысы (линии PtK1 и PtK2), которые, хотя и трансфецируются только с низкой эффективностью, однако, содержат небольшое количество хромосом, которые легче различать в микроскоп. Некоторые другие линии почечных клеток, в том числе одна от свиньи (LLC-PK1) и вторая – от африканской зеленой мартышки (BS-C-1), в процессе митоза также остаются прикрепленными к субстрату и намного более восприимчивы к трансфекции. Эти клетки (свиньи и мартышки) содержат больше хромосом, чем клетки кенгуровой крысы, но легче трансфецируются и дают изображения, что делает их превосходным альтернативным материалом для исследования митоза. Кроме пригодности для наблюдений митотического веретена, клетки, остающиеся плоскими на стекле культуральной камеры во время деления, могут выявлять распределение других клеточных компонентов, таких, как комплекс Гольджи, элементы цитоскелета, эндоплазматическая сеть и митохондрии.

Исследования цитоскелета следует проводить на клетках, проявляющих высокие уровни экспрессии и с характерной локализацией исследуемого белка (белков). Как правило, нитевидные актиновые стрессорные волокна намного более четко определяются в фибробластах, чем в эпителиальных клетках, однако, из этого правила существует множество исключений. В цитоплазме эпителиальных клеток некоторых линий, (хотя, и не повсеместно), промежуточные филаменты цитокератина образуют разветвленные сети, которые легко визуализируются за счет иммунофлуоресценции или флуоресцентных белков. К

сожалению, в клетках фибробласта, как и во многих типах эпителиальных и эндотелиальных клеток, цитокератиновые сети либо плохо определяются, либо практически отсутствуют. Аналогично, виметин, дезмин, периферин, нейрофиламенты, ламины и промежуточные филаменты глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) образуют заметные структурные сети в клетках одних типов, и трудно обнаруживаются в других. Практически во всех случаях, прежде чем пытаться локализовать флуоресцентные белки для получения изображений живых клеток, необходимо зафиксировать и протестировать линию клеток-мишеней путем маркировки синтетическими флуорофорами и/или антителами.

Использование флуоресцентных белков для визуализации живых клеток открыло новые методы получения информации, касающейся динамических процессов в клеточной биологии. Современные методы флуоресцентной микроскопии, основанные на восстановлении после фотообесцвечивания (FRAP), резонансном переносе энергии (FRET), а также корреляционная спектроскопия (FCS) и спектр-микроскопия (FSM) в значительной степени способствовали использованию флуоресцентных белков. Эти вездесущие молекулы также были генетически модифицированы, с целью получения нового поколения фотоактивируемых оптических индикаторов, позволяющих метить отдельные специфические члены большой молекулярной популяции. В результате соединения методики Форстера по резонансному переносу энергии с технологией флуоресцентных белков получен новый класс физиологических биосенсорных зондов, пригодных для анализа различных ионов: кальция, натрия, калия, хлорида и pH, вдобавок к множеству клеточных явлений, включая ферментативную активность, изменения потенциала мембраны, высвобождение нейротрансмиттеров и окисление-восстановление. Все перечисленные новые методики базируются на получении изображений живых клеток, экспрессирующих генетически кодированные флуоресцентные зонды.

Огромное количество информации было получено при исследовании хорошо изученной иммортализованной линии эпителиальных клеток (HeLa) цервикальной карциномы человека. Эту сильную клеточную линию можно эффективно трансфецировать большинством векторов флуоресцентных белков, и получать высокие уровни экспрессии и определенную локализацию. Трансформированные клетки почки африканской зеленой мартышки (линия COS-7) использовались

для открытия динамики белка в комплексе Гольджи и эндоплазматической сети, тогда как линии клеток хомяка (ВНК-21 и СНО-К1) являются фаворитами в исследованиях молекулярной и клеточной биологии вирусов, внутриклеточной ферментативной активности, рецепторов, промоторных функций и механизмов транспортировки. Другие клеточные линии также восприимчивы к трансфекции, микроинъекциям и маркировке синтетическими флуорофорами в длительных экспериментах по получению изображений с помощью широкопольной и конфокальной флуоресцентной микроскопии.

Краткий обзор камер для визуализации изображений живых клеток

Камеры для образцов – это неотъемлемая часть истории микроскопии. На протяжении многих лет в публикациях описываются многочисленные конструкции, обладающие превосходными оптическими характеристиками и, в то же время, позволяющие сохранять образцы в течение различных промежутков времени. Краткосрочные (20–30 минут и менее) эксперименты с получением изображений можно проводить путем простого помещения покровного стекла, содержащего адгезивные клетки, на предметное стекло микроскопа с использованием разделителей, предотвращающих повреждение клеток (в клетках некоторых линий физический стресс может вызвать автофлуоресценцию). Для обеспечения водонепроницаемости и предотвращения испарения культуральной среды, покровное стекло можно закрепить любым из многочисленных герметиков, включая расплавленную агарозу, резиновый клей, вакуумную смазку или удобный препарат под названием VALAP (смесь 1:1:1 вазелина, ланолина и парафина). В качестве разделителей, предотвращающих непосредственный контакт клеток с предметным стеклом микроскопа, можно использовать прокладку из силиконового каучука (имеются на рынке), либо кусочки битого покровного стекла. Покровное стекло устанавливается на разделительную прокладку (прокладки) стороной с клетками вниз. Промежуток между покровным и предметным стеклами заполняется физиологическим буфером (например, физиологический раствор с фосфатным буфером, PBS). Края покровного стекла герметизируются предпочтительным реагентом, и предметное стекло помещается на предметный столик микроскопа для получения изображений. Без среды для выращивания и контроля температуры клетки могут нормально функционировать в течение всего лишь нескольких минут, однако, зачастую, этого времени достаточно для получения требуемых изображений.

Возможность наблюдения и получения изображений живых клеток на предметном столике микроскопа, а также содержание культуры в близких к оптимальным условиям, при проведении более длительных экспериментов обеспечивается специальными камерами с искусственным климатом. Как правило, камера для получения изображений оснащается стеклянным окном, толщиной, обычно, равной толщине покровного стекла (около 170 микрометров), которое позволяет без помех наблюдать клетки при помощи объективов, с большой числовой апертурой. Контроль температуры (критического параметра для большинства клеток), часто реализуется за счет использования периферийных источников инфракрасного излучения или нагретого воздуха (например, фена или нагревателя для яиц), металлической нагревательной пластины с термисторным управлением, подсоединенной непосредственно к камере, либо тонких оптически прозрачных покрытий из оксидов металлов, которые термически напыляются на поверхность покровного стекла, что обеспечивает более эффективную передачу тепла к камере.

Все многообразие имеющихся на рынке (либо изготавливаемых собственными силами) камер для получения изображений живых клеток делится на две основные функциональные категории: открытые камеры, аналогичные чашкам Петри, со свободным доступом к атмосфере; и закрытые камеры, которые герметизируются для защиты клеток от испарения культуральной среды. Камера открытого типа, как правило, обеспечивает быстрый доступ к выращиваемым клеткам, что позволяет выполнять микроинъекции, добавлять препараты, менять культуральную среду и выполнять другие манипуляции с клетками. И, напротив, закрытые камеры обеспечивают лучшую изоляцию от внешней среды, но затрудняют доступ к клеткам. Большинство закрытых камер оборудуется портами для пополнения свежей культуральной средой и препаратами в ходе эксперимента, что позволяет не прерывать последовательность получения изображений. В таких системах перфузия регулируется перистальтическим насосом, либо опрыскивателем с приводом от двигателя, либо при помощи гравитационного манифолда. В случае добавления в закрытую камеру свежих растворов очень важно предварительно уравнивать их температуру с температурой клеток. Более того, многие клетки чувствительны к сдвигу, поэтому, перфузию адгезивных клеток, соединенных с покровным стеклом необходимо выполнять с очень малыми скоростями. Некоторые,

наиболее современные камеры закрытого типа оснащаются системами контроля усилия сдвига.

В большинстве случаев, имеющиеся на рынке простейшие открытые камеры для получения изображений представляют собой обыкновенный сосуд для культивирования тканей или чашку Петри, с установленным на днище покровным стеклом. Предлагаются стандартные (диаметром 35 мм и 60 мм) стерильные чашки Петри, в которых просверлено небольшое отверстие (диаметром около одного сантиметра), а в пластмассу вплавлено покровное стекло толщиной 170 мкм, через которое можно получать изображения с высоким разрешением. Кроме того, на рынке имеются прямоугольные покровные стекла, а также предметные стекла с герметично прикрепленной пластмассовой камерой для получения изображений. В камере имеется одно или несколько углублений. Однако, такие камеры достаточно дороги. Обе упомянутые конструкции сравнительно просты в использовании, но не герметичны. Поэтому, в ходе эксперимента культуральная среда испаряется, в связи с чем, необходимо внимательно следить за ее уровнем. И, наконец, в большинстве простых камер для получения изображений нет никаких систем обогрева. Поэтому, при использовании таких камер, предметный столик микроскопа должен быть оборудован вспомогательной системой обогрева, способной вместить камеру с образцом. Без контроля температуры эффективность открытой камеры лишь немного выше, чем у описанной ранее системы, состоящей из уплотненных герметиком предметного и покровного стекол.

Герметичные закрытые камеры для получения изображений дороже большинства простых камер открытого типа, однако, предоставляют гораздо больше возможностей для контроля над окружающей средой, и позволяют сохранять клетки здоровыми в течение многих часов (и даже дней и недель). В типовой камере закрытого типа имеются две оптически правильные поверхности, разделенные перфузионным кольцом с уплотнительными прокладками. Эта многослойная конструкция зажимается в металлическом или композитном корпусе, обеспечивающем контроль температуры и адаптацию к предметному столику микроскопа. Такая камера для получения изображений, в сравнении с камерами открытого типа, обеспечивает достаточно высокую степень регулировки скорости перфузии, объема среды, температуры, атмосферы, геометрии потока и оптической стабильности. Современная закрытая камера сокращает затраты времени на замену жидкости, обеспечивает регулирование потока перфузионной среды,

(позволяя, тем самым, избежать сдвига адгезивных клеток), высокоточную регулировку температуры и непосредственную близость оптических поверхностей, что дает возможность использовать для наблюдений объективы (микроскопов) с высокой числовой апертурой. Кроме того, пользователь имеет возможность задавать параметры потока культуральной среды на поверхности клеток в соответствии с требованиями эксперимента. Сегодня на рынке представлен широчайший спектр закрытых камер для получения изображений живых клеток.

Конструкция камеры для получения изображений позволяет эффективно объединять инкубатор с клеточной культурой и инвертированный микроскоп, обеспечивая практически полный контроль над окружающей средой. Кожух инкубатора изготавливается, как правило, из органического стекла и окружает предметный столик микроскопа, объективы, флуоресцентные фильтры и конденсор проходящего света. Такие камеры можно использовать с самыми различными сосудами для культивирования, включая стандартные культуральные сосуды, чашки Петри, предметные стекла микроскопов с установленными на них покровными стеклами, а также множество других, из уже упоминавшихся, открытых и закрытых систем. Температура поддерживается при помощи внешнего обогревателя (обычно, с принудительной подачей воздуха), а концентрация двуокиси углерода контролируется датчиком, соединенным с регулятором, через который подается чистый газ из баллона. Кроме того, такие камеры можно оснащать устройствами регулирования влажности, а в некоторых конструкциях предусмотрена система доступа исследователя в виде резиновых перчаток, что дает возможность выполнять операции с образцами (клетками) в процессе получения изображений, не нарушая равновесного состояния среды в камере. Для достижения высокой точности в поддержании температуры, некоторые из наиболее изоциренных инкубаторных камер вмещают в себя практически весь микроскоп, за исключением окуляров, фотокамеры и осветителей. С другой стороны, камеры с искусственным климатом могут препятствовать быстрому доступу к образцу, и утомлять в случае необходимости периодически манипулировать образцом. Кроме того, высокая влажность внутри камеры способствует ускоренному разрушению смазки редукторов, а также окислению металлических поверхностей и покрытий линз, что повышает эксплуатационные затраты. Многие производители часто предлагают для своих инвертированных микроскопов инкубаторы специальной конструкции, а поставщики вторичного рынка заполняют ниши, как

более простыми, так и более сложными моделями, наряду с несметным количеством полезных принадлежностей.

На рисунке 24 представлена система микроперфузии CellASIC ONIX-2, Millipore CellASIC, с контроллером и манифолдом. (Merck (Millipore)). Данная система предназначена для создания *in vivo*-like-условий при исследовании клеточных процессов в динамике. Система позволяет поддерживать температуру, подачу питательных веществ и газов, в течении 3-х дней. Уникальность системы состоит в оснащении микроперфузионными каналами, через которые осуществляется диффузия питательных веществ из капилляра в микрокамеру с клетками, по аналогии с системой капиллярных сосудов, что позволяет симулировать условия *in vivo*.



Рис. 24. Система микроперфузии CellASIC ONIX-2, Millipore CellASIC, с контроллером и манифолдом

(<https://www.dia-m.ru/catalog/lab/bioimidzhing-sistemy-avtomaticheskoy-vizualizatsii-i-kletochnogo-skrininga/sistema-mikroperfuzii-cellasic-onix-2-millipore-cellasic-s-kontrollerom-i-manifoldom/>)

Методы исследований: фазовый контраст, флуоресцентная, конфокальная, TIRF, DIC.

- система совместима с любыми инвертированными микроскопами;
- формат микроперфузионного планшета – 96-луночный планшет;
- 4 независимых камеры для культивирования и наблюдения за объектами, объемом 5–50 мкл;
- 8 каналов для подачи реагентов в каждую камеру;
- термостатирование камеры в диапазоне от комнатной до + 40 °С;
- давление в системе до 70 кПа;

- возможность подачи как чистого газа, так и готовой смеси (CO₂, O₂, азот);
- габариты (Ш×Г×В), мм – 310×257×163.

Пространственная разрешающая способность методов биовизуализации

Наиболее существенным недостатком всех форм флуоресцентной микроскопии (в том числе широкопольной, лазерной сканирующей, мультифотонной и TIRF) является ограничение пространственного разрешения, которое было впервые открыто и описано Эрнстом Аббе (Ernst Abbe) в конце 1800-х гг. В настоящее время, современные и хорошо зарекомендовавшие себя методы флуоресцентной микроскопии могут легко разрешать различные структуры в изолированных клетках и тканях, такие как ядра, митохондрии, аппарат Гольджи, цитоскелет и эндоплазматическая сеть. Различные режимы флуоресцентной визуализации часто используются для отслеживания динамики белков и сигнальных пептидов, а также для мониторинга других взаимодействий в живых клетках. Ограниченное пространственное разрешение, однако, исключает возможность определять важные структуры, включая синаптические пузырьки, рибосомы или молекулярные взаимодействия, которые выходят за рамки диапазонов обнаружения флуоресцентной микроскопии.

Дифракционный предел в оптической микроскопии означает, что при визуализации точечного источника света, прибор дает размытое и дифрагированное пятно в плоскости изображения с размером, ограниченным минимальным расстоянием при котором две точки могут быть разделены.

Конфокальная микроскопия (конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, (confocal laser scanning microscopy)) – **разновидность световой оптической микроскопии, обладающей значительным контрастом и пространственным разрешением** по сравнению с классической световой микроскопией, что достигается использованием точечной диафрагмы, размещённой в плоскости изображения и ограничивающей поток фонового рассеянного света, излучаемого не из фокальной плоскости объектива. Это позволяет получить **серии изображений на различных глубинах фокальной плоскости внутри образца** (т.н. оптическое секционирование образца по глубине), и затем реконструировать трехмерное изображение образца из этих серий. **Основным принципом**, лежащим в основе этих методов,

является то, что **расположение одной молекулы может быть локализовано с точностью до нескольких нанометров (или выше), если собрано достаточное количество фотонов и рядом отсутствуют аналогично излучающие молекулы в диапазоне приблизительно 200 нанометров.**

Самыми востребованными из этих методик являются PALM, STORM и эти подходы не требуют модификации оптических характеристик стандартного инвертированного микроскопа и могут быть реализованы с помощью любого коммерческого прибора, способного регистрировать изображение единичных молекул. Конфокальная микроскопия получила широкое применение в области биологии, медицины, материаловедения и физике полупроводников

Иммунофлуоресценция

В основе метода иммуноокрашивания лежит специфическое связывание антител с антигенами. В каждой молекуле иммуноглобулина существует, по крайней мере два идентичных антигенсвязывающих центра. Эта бивалентность позволяет антителам перекрестно связывать антигены с двумя или более антигенными детерминантами. Подвижность плеч молекулы антител позволяет ей связываться одновременно с антигенными детерминантами, находящимися на разных расстояниях. Часто вместо ферментной метки первичных или вторичных антител используют флуорохромы.

Fluorochrome, fluorophore (лат. fluor – течение, поток и греч. chroma – цвет, окраска) – флуоресцирующий краситель, природное или синтетическое соединение, которое после облучения УФ или синими лучами начинает испускать (флуоресцировать) характерное свечение. Согласно представлениям квантовой химии, электроны в атомах расположены на энергетических уровнях. Расстояние между энергетическими уровнями в молекуле зависит от её строения. При облучении вещества светом возможен переход электронов между различными энергетическими уровнями. Разница энергии между энергетическими уровнями и частота колебаний поглощённого света соотносятся между собой уравнением (II постулат Бора): $E_2 - E_1 = h\nu$. После поглощения света часть полученной системой энергии расходуется в результате релаксации. Часть же может быть испущена в виде фотона определённой энергии. Спектр флуоресценции сдвинут относительно спектра поглощения в сторону длинных волн. Это явление получило название «Стоксов сдвиг». Его причиной являются безизлучательные релаксационные процессы. В результате часть энергии поглощённого фотона

теряется, а испускаемый фотон имеет меньшую энергию, и, соответственно, большую длину волны

По химическому строению флуорохромы представляют собой обычно ароматические и гетероциклические соединения с электрон донорными и/или электроноакцепторными заместителями. Флуорохромы используются при флуоресцентной микроскопии, при гибридизации (FISH), проточной цитометрии и других методах исследования.

Характеристики идеального флуорохрома

- Пик абсорбции должен быть в пределах возбуждающей длины волны, доступной для детекции лабораторным оборудованием (большой коэффициент угасания при возбуждающей длине волны).
- Яркая флуоресценция (высокий квантовый выход).
- Узкий эмиссионный спектр, который попадает в спектр, обнаруживаемый оборудованием.
- Хорошая фотостабильность (на свету).
- Флуоресцентные свойства не меняются, в зависимости от конъюгации с антителом или локального окружения образца.

Методы иммунофлуоресцентного окрашивания

В настоящее время выделяют несколько методов иммуноокрашивания: это прямой и непрямой метод иммуноокрашивания, и непрямой метод окрашивания с усилением сигнала.

1. Прямой метод окрашивания показан на рисунке 25.

Преимущества прямой иммунофлуоресценции:

- более короткое время окрашивания образцов;
- простота двойной окраски;
- при использовании АТ, полученных от одного вида, например, 2 моноклональных мышинных, необходимо применять прямой метод окраски.

Недостатки прямой иммунофлуоресценции:

- слабый сигнал и более высокая стоимость;
- меньшая гибкость и трудности в процедуре, если недоступны промышленно помеченные конъюгаты.

Принципы иммунофлуоресцентного окрашивания

Прямой метод окрашивания.

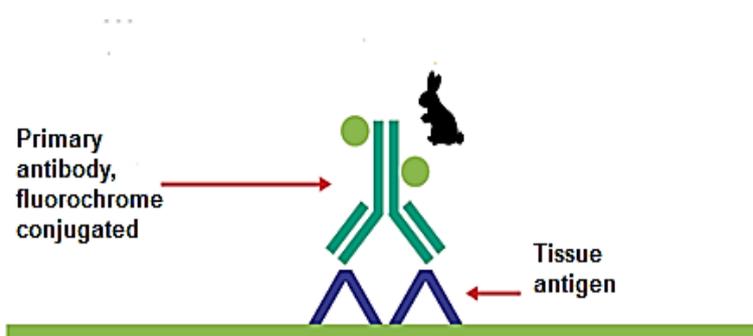


Рис. 25. Прямой метод иммунофлуоресцентного окрашивания

2. **Непрямой метод окрашивания** представлен на рисунках 26–27.

Принципы иммунофлуоресцентного окрашивания

Непрямой метод окрашивания.

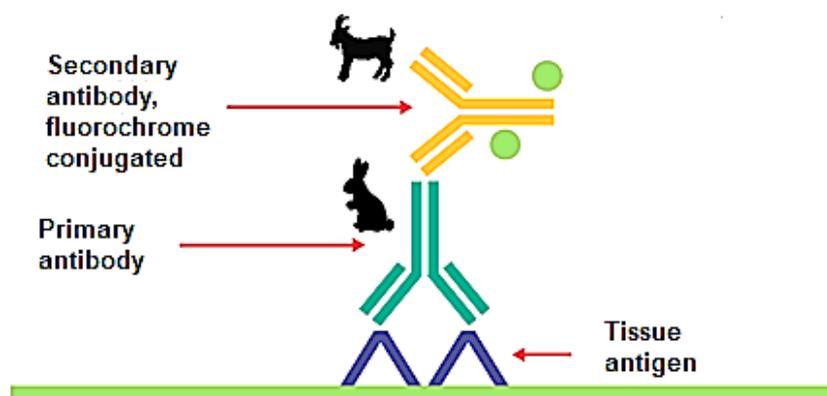


Рис. 26. Непрямой метод иммунофлуоресцентного окрашивания

Этапы иммунофлуоресцентного окрашивания:

1. Фиксация исследуемого объекта.
2. Обработка образца и приготовление срезов.
3. Демаскирование антигена (antigen retrieval).
4. Повышение проницаемости (permeabilization).
5. Блокирование неспецифического связывания антител.
6. Обработка препаратов антителами.
7. Заключение препаратов.

Принципы иммунофлуоресцентного окрашивания

Непрямой метод окрашивания с усилением сигнала.

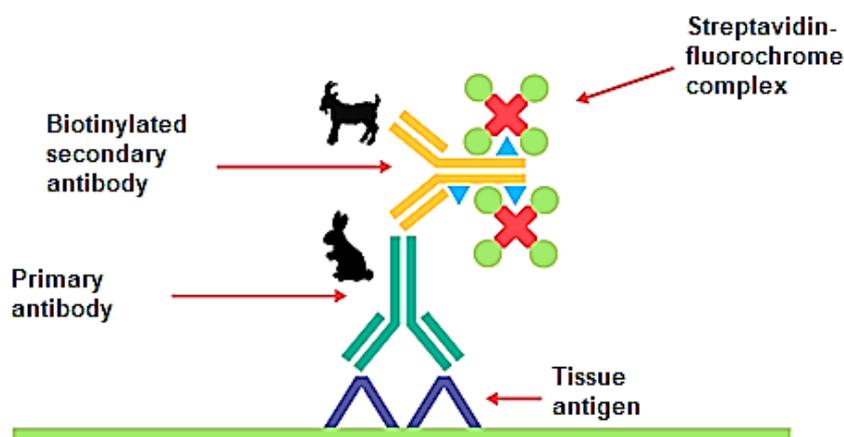


Рис. 27. Непрямой метод окрашивания с усилением сигнала

Чем может быть вызвано неспецифическое окрашивание?

Неспецифическое окрашивание может быть вызвано рядом причин:

1. Связывание как первичных, так и вторичных антител с Fc-рецепторами исследуемого образца.
2. Связывание вторичных антител с эндогенными антигенами.
3. Ионные и гидрофобные взаимодействия между антителами и эндогенными макромолекулами образца.

Блокирование неспецифического связывания антител:

- ✓ BSA.
- ✓ Сыворотка неиммунизированного животного – хозяина вторичных антител.
- ✓ Моновалентные Fab-фрагменты против первичных антител.

Разведение антител, время и температура инкубации – все имеет больше значения для качественной реакции. Заключение препаратов является последним этапом иммуноокрашивания. Следует помнить, что среда для заключения входит в элемент оптической системы микроскопа и является молекулярным окружением флуорохрома.

Мультиплексные технологии тканевого имиджинга

Одной из новейшей мультиплексной технологии тканевого имиджинга является технология TSA – Tyramide Signal Amplification (технология усиления сигнала с использованием тирамида). Реагенты, основанные на технологии тирамид-сигнальной амплификации (TSA),

усиливают сигнал от маркеров с низкой экспрессией и позволяют исследователям использовать привычные первичные антитела одного видового происхождения для всех маркеров. С помощью TSA можно окрасить срез на восемь маркеров одновременно. Процедура предельно проста: это классическая ИГХ с чуть видоизмененными конечными этапами. В качестве вторичных – визуализирующих – антител используются антитела, меченные пероксидазой хрена, после чего добавляется конъюгат тирамида с флуорохромом. Тирамид – органическое вещество, которое в присутствии пероксидазы в силу ее ферментативной активности присоединяется к органическим молекулам вокруг (в данном случае к первичному, вторичному антителу и даже самому маркеру).

Принцип тирамид-сигнальной амплификации (рис. 28)

Антиген последовательно инкубируется с первичными и вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, после чего добавляется тирамид с флуоресцентной меткой. Этот комплекс ковалентно связывается с белковыми молекулами (антигеном и обоими антителами).

Преимущества мультиплексного ИГХ исследования:

- Усиление сигнала от 10 до 100 раз.
- Оценка интенсивности экспрессии.
- Выбор лучших первичных антител.
- Модульность и гибкость в подборе реагентов.
- мультиплексное ИГХ позволяет изучать взаимодействий клеток в ткани.
- Получать больше информации из одного образца.
- Измерять расстояния между клетками.
- Позволяет количественно измерять экспрессии маркеров.
- Производить комплексное фенотипирование по совокупности маркеров.

Следует отметить, что вся процедура мультиплексного окрашивания достаточно долгая и занимает 2 дня для четырехцветного окрашивания и 3 дня для семицветного окрашивания. Для процедуры мультиплексного окрашивания создан прибор, позволяющий полностью автоматизировать протокол Ора 1 – это приборы Bond RX/RXm. Также существуют различные автоматические системы для автоматической



Рабочая станция Mantra™

- Работа с одним стеклом
- Ручное управление



Автоматическая система Vectra® 3

- Загрузка 6 или 200 стекол
- Автоматическая съемка
- Работа с TMA



Автоматическая система Vectra® Polaris™

- Загрузка 80 стекол
- 40x съемка флуоресцентных изображений и в светлом поле
- Автоматическая съемка
- Работа с TMA
- Защита от выцветания

Рис. 29. Системы для автоматической съемки и работы с изображениями

Проточная цитометрия

Проточная цитометрия – это технология, позволяющая измерять и анализировать различные физические характеристики отдельных частиц,двигающихся в потоке жидкости и проходящих через луч лазера. Суть проточной цитометрии, можно изложить всего одним предложением: поток клеточной суспензии в ячейке сжимается, клетки выстраиваются в очередь и проходят через лазерный луч, регистрация рассеяния от которого позволяет охарактеризовать каждую клетку в потоке индивидуально.

Проточный цитометр включает в себя несколько систем:

1. Гидравлическая система доставляет образец в зону измерения.
2. Оптическая система состоит из источника света, фокусирующей оптики и оптики, собирающей световые сигналы разных длин волн.
3. Электронная система преобразует оптические импульсы в электрические, обрабатывает их и передает в компьютер данные об образце.

Когда частица пересекает лазерный луч, возникает эффект светорассеяния. Его характеристики зависят от физических свойств

частицы. Проточный цитометр обладает двумя детекторами светорассеяния, позволяющими делать выводы о размерах и структуре клеток. Прямое светорассеяние (FSC) определяет размеры клеток или частиц. Боковое светорассеяние (SSC) определяет гранулированность и внутреннюю структуру. Комбинация бокового и прямого светорассеяний позволяет судить о морфологии клетки в целом и выделять различные популяции клеток для дальнейшего анализа. Когда клетки или частицы связаны при помощи антител с флуорохромами, при их прохождении через лазерный луч наблюдается флуоресценция, которую также можно измерить.

Сигналы флуоресценции и светорассеяния регистрируются различными детекторами. Информация от детекторов используется компьютерным алгоритмом, который позволяет в наглядной форме «посчитать» клетки и разделить их на отдельные популяции, отличающиеся друг от друга по каким-то важным параметрам, интересующим исследователя.

Основные принципы проточной цитометрии включают в себя несколько аспектов:

- ✓ Получение и анализ суспензии клеток или частиц с размерами 0,2–150 мкм.
- ✓ Частицы двигаются в потоке жидкости в его центральной части («сердцевине»).
- ✓ Когда клетка или частица проходит через луч лазера, она рассеивает свет или флуоресцирует.
- ✓ Световые сигналы преобразуются в электрические с помощью детекторов (фотоэлектронных умножителей, ФЭУ).
- ✓ Некоторые параметры можно измерить для каждой клетки в отдельности.
- ✓ Собранные и сохраненные данные можно проанализировать, чтобы получить информацию об образце.

Методом проточной цитометрии можно исследовать прокариотические и эукариотические клетки; вирусы, бактерии и грибы; комплексы антиген-антитело; клеточные агрегаты (опухоли); многоклеточные организмы. В качестве биоматериала для проточной цитометрии может служить кровь, костный мозг, ликвор, суставная жидкость, плевральная жидкость, асцитическая жидкость, солидные опухоли и гомогенат ткани.

Иммунофенотипирование клеток, осуществляемое с помощью проточной цитофлуориметрии, широко применяется в клинико-диагностических и научных исследованиях. Отличительной чертой данного анализа является возможность определения фенотипа единичных клеток. Метод основан на применении моноклональных антител к антигенам дифференцировки, сочетание которых позволяет выявлять разнообразные клеточные популяции. Проточная цитофлуориметрия за последние десятилетия стала неотъемлемым исследованием в диагностике различных гематологических заболеваний, в частности лимфом, лейкозов, плазмноклеточных неопластических заболеваний, пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ) и др. На основании данных об иммунофенотипе и анализе большого количества клеток проточная цитофлуориметрия позволяет находить крайне редко встречающиеся клеточные субпопуляции. Подсчет количеств тех или иных клеток в образце и их соотношений важен для диагностики, изучения ответа на терапию, раннего обнаружения рецидива болезни, контроля состава трансплантата при трансплантации костного мозга и т.д.

Клеточный сортинг – особенное направление проточной цитометрии (рис. 30). Классический цитофлуориметрический сортинг (FACS, от Fluorescence Activated Cell Sorting) использует лазерные лучи и детекторы, чтобы охарактеризовать клетки в суспензии. То есть первая часть сортера – это тот же проточный цитометр. Но вот далее клетки разделяются на нужные исследователю фракции физически: под влиянием управляемых воздействий; в режиме реального времени; и исходя из тех параметров, которые были обнаружены шагом ранее. В классическом варианте разделение означает, что в систему добавлены электромагниты, которые определяют, в какую пробирку попадет проанализированная клетка. В зависимости от настроек протокола и нужд исследователя, в качестве критериев могут быть использованы, например, размер клеток и интенсивность флуоресценции одного маркера или их комбинации. Существуют различные стратегии выделения клеток, но совмещение в себе скорости сортировки, чистоты и выхода сортируемых популяций клеток реализовано **только в технологии проточной цитометрии.**

Пользователи могут создать в системе свои правила по стратегии сортировки на основании местоположения клетки/клеток в капле (т.н. **маски сортировки или «Precision Mode»**). Существуют различные режимы сортировки (сингл, плюрифай и энрич), **предопределяю-**

щих степень чистоты и выхода клеток в конкретном эксперименте. Одни режимы направлены на увеличение вероятности местонахождения клеток интереса в емкости для сортируемых фракций, другие разработаны с целью исключения нежелательных клеток и уменьшения контаминации образца. В проточном цитометре, оборудованном системой для сортировки клеток, **проточная ячейка закреплена на пьезокристалле**. При подаче на него напряжения кристалл вместе с ячейкой совершает колебания с заданной частотой, в результате чего струя жидкости с клетками разбивается на отдельные капли. **Проходя сквозь заряжающее кольцо, капля может приобретать положительный или отрицательный заряд** в зависимости от того, какая клетка содержится внутри капли. **Пролетая мимо отклоняющих пластин, капля с клеткой притягивается к ним, выходит из основного потока и попадает в пробирку.**

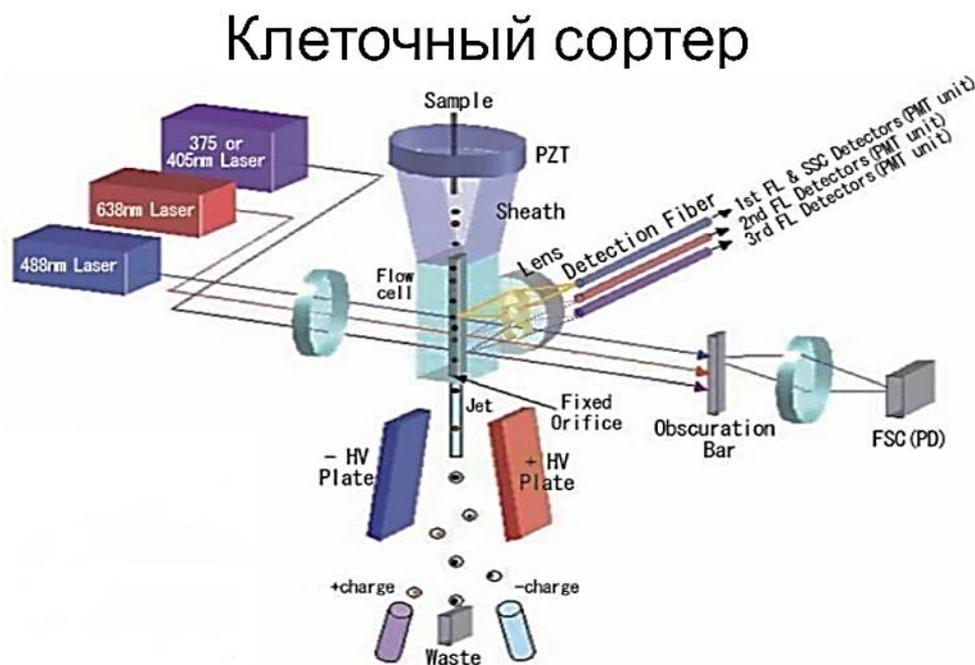


Рис. 30. Клеточный сортер
(<https://bga.su/?gid=764>)

Преимуществами сортировки клеток на проточном цитометре является высокая чистота получаемой популяции клеток (до 99,9% позитивных клеток в отсортированной фракции), возможность сортировать клетки по любым комбинациям детектируемых параметров. Данный метод позволяет отсортировать любое количество клеток, вплоть до единичных клеток, что является незаменимым в технологиях, связанных с клонированием.

РАЗДЕЛ 4

БИОТЕХНОЛОГИИ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

ЛЕКЦИЯ 10

ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЕ ОПЛОДОТВОРЕНИЕ: ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ И СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ МЕТОДА

Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) – собирательный термин, обозначающий методы, применяемые для достижения беременности искусственным или частично искусственным путем.

К ним относятся:

- искусственная инсеминация (ИИ),
- экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО),
- интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в яйцеклетку (ИКСИ),
- преимплантационная генетическая диагностика (ПГД),
- криоконсервация гамет и эмбрионов,
- репродуктивные технологии, использующие донорские гаметы,
- суррогатное материнство,
- гормональная стимуляция овуляции.

Основная задача ВРТ – рождение здорового ребенка при сохранении здоровья матери.

Экстракорпоральное оплодотворение (от лат. extra – снаружи, вне и лат. corpus – тело, то есть оплодотворение вне тела, сокр. ЭКО) – вспомогательная репродуктивная технология, используемая в случае бесплодия. Синонимы: «оплодотворение в пробирке», «оплодотворение in vitro», «искусственное оплодотворение», в английском языке обозначается аббревиатурой IVF (in vitro fertilisation). Во время ЭКО яйцеклетку извлекают из организма женщины и оплодотворяют искусственно в условиях «in vitro» («в пробирке»), полученный эмбрион содержат в условиях инкубатора, где он развивается в течение 2–5 дней, после чего эмбрион переносят в полость матки для дальнейшего развития.

История развития ЭКО

В наше время экстракорпоральное оплодотворение – общедоступная процедура, которую проводят в клиниках по всему миру. Она помогла миллионам женщин, страдающим бесплодием. Тем не менее, далеко не все знают, что у истоков экстракорпорального оплодотворения стояли Советские ученые. Именно в ноябре 1955 г. в стенах Крымского медицинского института впервые в мире была оплодотворена женская яйцеклетка вне организма человека. Отцом и вдохновителем метода экстракорпорального оплодотворения яйцеклетки человека вне организма можно смело считать советского ученого, профессора, заведующего кафедрой гистологии и эмбриологии Крымского медицинского института **Бориса Павловича Хватова**. Еще в 40-х годах он приобрел богатый опыт по исследованию методов искусственного оплодотворения животных, что привело его к идее оплодотворения яйцеклеток женщины вне организма. Впервые возможность искусственного оплодотворения яйцеклетки человека вне организма и дальнейшего культивирования эмбрионов в питательных средах профессор Хватов высказал в начале 50-х годов. Идею Бориса Павловича успешно реализовал его ученик, на тот момент аспирант медицинского института, а в будущем ученый Григорий Николаевич Петров (рис. 31). Именно ему профессор доверил непосредственное проведение фундаментальных исследований по оплодотворению яйцеклеток человека вне организма. Г.Н. Петров впервые в мире подробно описал все стадии оплодотворения яйцеклетки и дробление эмбриона в инкубаторе. 10 ноября 1955 г. был получен первый в мире полноценный зародыш человека вне организма женщины.

Григорий Николаевич сутками наблюдал за этапами оплодотворения и дробления полученного эмбриона в инкубаторе. Он описал увиденное и сфотографировал весь процесс оплодотворения – в то время подобных работ не было. Итоги этих и последующих уникальных исследований были представлены в его кандидатской диссертации «Процессы оплодотворения яйцеклеток некоторых млекопитающих животных и человека», защищенной в Крымском медицинском институте в 1959 г. Активно работы проводились с 1955 по 1964 г. В 1966 г. крымские ученые сделали вывод о возможности успешной трансплантации зародышей в матку после их культивирования в течение 2–3 дней вне организма.



Рис. 31. Петров
Григорий Николаевич
(1926–1997)

Однако, в то время Крымский обком партии запретил проводить «эксперименты над советскими женщинами». Поэтому работы в институте были прекращены, и информация о них больше не попадала в научные медицинские издания. И только в 1969 г. британский ученый-физиолог, в будущем лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине 2010 г. **Роберт Эдвардс** заявил, что разработал технологию ЭКО. Он установил, что созревание женских яйцеклеток *in vitro* происходит в течение 36–37 ч. после пика ЛГ. Кстати, в его Нобелевской лекции есть ссылки на работы Григория Николаевича Петрова.

Австралийский гинеколог **Карл Вуд** возглавлял группу по ЭКО при университете Монаш, которая добилась ЭКО беременности у человека в 1973 г. посредством искусственного оплодотворения. Оплодотворенная яйцеклетка была пересажена в матку, однако через несколько дней была отторгнута из неё естественным путем. Первого существенного успеха добилась группа из Великобритании. В 1977 г. они успешно оплодотворили яйцеклетку, совершили перенос эмбриона в полость матки женщине. На свет в 1978 г. появилась первая девочка «из пробирки» – Луиза Браун. У Луизы есть свои дети, которых она, кстати, зачала вполне естественным путем.

Первое официальное успешное ЭКО в СССР было проведено в 1985 г. Процедуру искусственного оплодотворения провели врачи Центра охраны здоровья матери и ребенка (г. Москва). В феврале 1986 г. на свет появилась девочка. В этом же году в Ленинграде родился мальчик, также полученный в результате успешного ЭКО. Понадобилось больше 20 лет, чтобы доказать, что первые исследования в

области ЭКО проводились в СССР. И сегодня исследования Григория Петрова, как автора первых в мире публикаций по данной теме включены в монографию Кембриджского университета «Пионеры ЭКО в мире», что является фактом признания зарубежных коллег приоритета ученых Крымского медицинского института.

Технология экстракорпорального оплодотворения

Выполняется лечение методом ЭКО поэтапно. Основные этапы процедуры ЭКО включают:

1. Подготовка к ЭКО. Проведение предварительного обследования бесплодной пары и определение схемы лечения.
2. Лечение инфекций, гормональных отклонений и нарушений сперматогенеза.
3. Стимуляция суперовуляции (созревания нескольких яйцеклеток в одном менструальном цикле женщины).
4. Получение яйцеклеток путем пункции яичников, получение сперматозоидов.
5. Оплодотворение яйцеклеток «в пробирке».
6. Выращивание эмбрионов до 2–5-дневной стадии.
7. Перенос эмбрионов в полость матки.
8. Гормональная поддержка ранней стадии беременности после ЭКО.
9. Тест на беременность на выявление гормона ХГЧ в крови (через 2 недели после переноса эмбрионов).
10. УЗИ-диагностика беременности.

Первый диагностический этап обычно длится около 2–3 месяцев. За это время пара посещает специалистов, проходит ряд обследований для выявления причин бесплодия. При необходимости проводится лечение выявленных заболеваний и отклонений. Если не удастся достичь беременности даже после коррекции выявленных отклонений, проводится процедура ЭКО. Длительность процедуры ЭКО от начала лечения до подтверждения беременности зависит от протокола и может занимать от 25 до 45 суток. В этот период проводятся все этапы от стимуляции яичников до инкубации зародыша и наблюдения за ходом имплантации.

ПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ЭКО

➤ **Непроходимость маточных труб:**

1. Инфекционно-воспалительные заболевания органов малого таза.
2. Перенесенные в анамнезе инфекции, передающиеся половым путем, особенно такие, как гонорея, которая после себя оставляет разлитой спаечный процесс.
3. Любого рода оперативные вмешательства, проводимые на матке и маточных трубах, так как влекут за собой образование спаечного процесса.
4. Врожденные аномалии развития маточных труб.

➤ При наличии факта отсутствия наступления беременности, возраста женщины старше 30 лет, наличии в анамнезе более 5 лет лечения с применением консервативной терапии непроходимости фаллопиевых труб, уже имеющаяся попытка оперативной коррекции проходимости – пластика маточных труб, проведенная более чем 1 год назад, у женщины является для ЭКО показанием.

➤ Если медикаментозная, а вернее, консервативная терапия не дает эффекта, то приступают к хирургическим методам лечения, суть которых заключается в пластической хирургии труб.

➤ **Идиопатическое бесплодие**, ситуация, при которой все методы диагностики были выполнены, но не один не дал результатов о том, что является причиной бесплодия у конкретной женщины.

➤ **Диагноз эндометриоз, который при использовании всех видов медикаментозной и хирургической коррекции не поддавался лечению.**

➤ **Патологические состояния сперматозоидов у мужчины и как следствие невозможность оплодотворения яйцеклетки.**

- ✓ Азооспермия – патологическое состояние, при котором в эякуляте просто нет сперматозоидов.
- ✓ Акиноспермия – состояние, при котором в эякуляте достаточное количество мужских половых клеток, но они неподвижны.
- ✓ Астенозооспермия – процесс, при котором сперматозоиды не так подвижны, как необходимо для их достижения яйцеклетки.
- ✓ Гемоспермия – присутствие геморрагического компонента в сперме.
- ✓ Гипоспермия – уменьшение количества спермы.
- ✓ Некроспермия – присутствие в семенной жидкости нежизнеспособных половых клеток.

- ✓ Пиоспермия – это присутствие воспалительных элементов, а по-просту говоря, гноя в сперме.
- ✓ Тератозооспермия – большой процент содержания патологически измененных сперматозоидов.

Противопоказания к процедуре

Любой цикл ЭКО не может быть назначен в следующих ситуациях:

- врожденные или приобретенные пороки матки;
- отсутствие матки;
- непереносимость используемых в программе препаратов;
- пороки сердца;
- инсульт в анамнезе;
- серьезные заболевания кровеносной системы;
- значительные нарушения работы щитовидной железы;
- заболевания гипоталамо-гипофизарной системы;
- почечные заболевания;
- злокачественное образование любой локализации;
- психические расстройства.

Технологию ЭКО осуществляют в специализированных медицинских учреждениях в условиях амбулаторного лечения.

Для проведения процедуры экстракорпорального оплодотворения необходимо:

- получить яйцеклетки,
- получить сперматозоиды,
- провести оплодотворение *in vitro*,
- вырастить эмбрион,
- ввести эмбрион в полость матки женщины.

Получение яйцеклеток

Как правило, для экстракорпорального оплодотворения стараются получить несколько яйцеклеток, так как это повышает эффективность лечения бесплодия этим методом. Поскольку в норме у женщины в течение одного менструального цикла созревает одна яйцеклетка, то для получения нескольких яйцеклеток проводят так называемую процедуру «стимуляции суперовуляции». Для этого пациентке назначают инъекции гормональных препаратов.

Овариальная стимуляция – это фармакологическая стимуляция одномоментного развития и созревания пула фолликулов с целью получения множества ооцитов при их пункции.

Для стимуляции суперовуляции в цикле ЭКО используют гормональные препараты и определяется схема их применения, называемая **«протокол стимуляции»**.

Для стимуляции используют инъекции препаратов фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), лютеинизирующего гормона (ЛГ), хорионического гонадотропина (ХГ), в сочетании с агонистами или антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ). Режим введения определенных препаратов-индукторов суперовуляции называют «схемой стимуляции» или «протоколом». Существует несколько схем стимуляции суперовуляции, но окончательное количество, виды и длительность введения препаратов подбирают индивидуально для каждой женщины, в зависимости от ее возраста, причины бесплодия и фолликулярного (яичникового) резерва. Стимуляция суперовуляции может занимать от 7 до 20 дней и представляет собой инъекции или прием таблетированных препаратов. Стимуляция суперовуляции проводится для получения в цикле ЭКО нескольких яйцеклеток – от 10 до 20 (точная норма яйцеклеток при ЭКО зависит от организма пациентки), пригодных для оплодотворения. Такое количество яйцеклеток при ЭКО необходимо для того, чтобы увеличить вероятность наступления беременности в одной попытке ЭКО, так как не все яйцеклетки могут быть хорошего качества, некоторые могут не оплодотвориться, а эмбрионы могут остановиться в развитии.

Пункция фолликулов при ЭКО проводится через 36 ч после инъекции хорионического гонадотропина человека (ХГЧ), который активирует овуляцию созревших фолликулов. Использование ХГЧ позволяет получить созревшую яйцеклетку, готовую к оплодотворению. При выборе стартовой дозы гонадотропинов рекомендуется учитывать следующие параметры пациентки: овариальный резерв, возраст, ИМТ.

Преждевременный разрыв фолликула может свести на нет проведение ЭКО. Поэтому, чтобы собственные гормоны женщины не мешали стимуляции суперовуляции и для контроля процесса суперовуляции, выработка собственных гормонов блокируется агонистами и антагонистами (•аГнРГ агонисты (декапептил, диферелин, бусерелин, золадекс, супрефакт); •антГнРГ антагонисты (оргалутран, цетротид)

Выбор протокола овариальной стимуляции

1. Протоколы с аГнРГ рекомендованы пациенткам:

- ✓ – при отсутствии риска развития СГЯ (синдром гиперстимуляции яичников),
- ✓ – при асинхронном росте фолликулов,
- ✓ – при преждевременной овуляции на фоне протокола с антГнРГ.

2. Протокол с антГнРГ рекомендован пациенткам:

- ✓ – с избыточным овариальным резервом,
- ✓ – с дефицитом массы тела,
- ✓ – с нормальным овариальным резервом и первым предстоящим протоколом ЭКО,
- ✓ – донорам ооцитов,
- ✓ – с СГЯ в анамнезе.

3. В качестве триггера финального созревания ооцитов применяют препараты ХГЧ и аГнРГ.

- ✓ – риске развития СГЯ, рекомендуется в качестве триггера финального созревания ооцитов использовать аГнРГ

При стимуляции суперовуляции необходимо регулярно контролировать рост фолликулов с помощью трансвагинального УЗИ. Контроль роста фолликулов проводится через день, начиная с пятого дня стимуляции. Также возможна корректировка дозы назначенных препаратов. Некоторым пациенткам могут быть назначены анализы крови на содержание эстрадиола. В норме уровень эстрадиола в крови возрастает по мере созревания фолликулов, а уровень прогестерона остается низким до момента овуляции.

С помощью УЗИ и исследования гормонов крови врач определяет, когда фолликулы готовы к пункции. Фолликулы обычно растут на 1–2 мм в день, а зрелые фолликулы имеют диаметр 16–20 мм. Когда фолликулы созреют, то можно проводить их пункцию, в результате которой будет получена фолликулярная жидкость, содержащая яйцеклетки. Во время УЗИ также обязательно исследуется толщина и структура эндометрия. К моменту назначения пункции эндометрий должен быть толще 7 мм и иметь трехслойную структуру.

Когда фолликулы достигли нужного размера (обычно на 10–14 день цикла), проводится инъекция ХГЧ. Введение ХГЧ позволяет контролировать точное время овуляции – обычно она происходит через 36–40 ч после инъекции. Пункция яичников проводится до того, как произойдет овуляция, обычно через 34–36 ч после инъекции ХГЧ.

До того, как в циклах ЭКО стали использовать агонисты и антагонисты ГнРГ, врачам приходилось прерывать почти четверть лечебных циклов из-за преждевременной овуляции. Если это происходило, фолликулы лопались еще до пункции, и яйцеклетки попадали в брюшную полость, откуда их уже невозможно было извлечь для оплодотворения в лаборатории.

Использование агонистов или антагонистов ГнРГ предотвращает выброс ЛГ и ФСГ гипофизом, снижая, таким образом, риск преждевременной овуляции. Однако и сегодня прерывают около 10% циклов, причем еще до инъекции ХГЧ. Наиболее частая причина отмены цикла – плохой ответ яичников пациентки на стимуляцию. Если в яичниках созревает менее трех фолликулов и уровень эстрадиола не достаточно высокий, вероятность наступления беременности крайне мала, то, по согласию пациентки, цикл ЭКО прерывают. Проблема плохого ответа яичников на стимуляцию чаще встречается у женщин старше 35 лет и женщин с оперированными яичниками, т.е. у тех пациенток, у которых снижен овариальный резерв (запас фолликулов в яичниках). Как следствие снижения количества фолликулов, повышается уровень ФСГ в крови. Возможна корректировка дозы препарата для стимуляции яичников, либо назначение более сильных по стимуляции препаратов, таких как рекомбинантные.

При созревании очень большого количества фолликулов (больше 25), либо при высоком уровне эстрадиола в крови приходится отменять цикл ЭКО в связи с угрозой развития синдрома поликистозных яичников (СПКЯ). В данном случае проводится пункция яичников и все полученные эмбрионы замораживаются. Прерывание цикла ЭКО на этой стадии происходит из-за риска возникновения синдрома гиперстимуляции яичников тяжелой степени, поскольку толчком для развития тяжелой формы СГЯ обычно служит наступление беременности. Эмбрионы могут быть позднее разморожены и использованы в другом цикле ЭКО без стимуляции суперовуляции. Пункция фолликулов проводится для получения яйцеклеток. Осуществляется при трансвагинальной пункции яичников для ЭКО путем откачивания фолликулярной жидкости через тонкую аспирационную иглу под контролем УЗИ.

Пункция фолликулов проводится под местным или кратковременным (10–20 мин) общим наркозом. Во влагалище находится трансвагинальный ультразвуковой датчик, с помощью которого визуализируются зрелые фолликулы, и тонкая игла вводится в фолликулы через

стенку влагалища. Яйцеклетки одна за другой отсасываются из фолликулов через иглу, присоединенную к аспирационному насосу. Пункция фолликулов обычно занимает не более 30 мин. Пункция фолликулов является малой хирургической операцией и не требует госпитализации. После пункции желательно отдохнуть в палате 2–3 ч.

Получение сперматозоидов для экстракорпорального оплодотворения

Сперму пациент получает самостоятельно. В случае невозможности получения спермы путем эякуляции, используют хирургические методы: аспирация содержимого эпидидимиса, биопсия яичка и прочее. Сперму получают в день пункции фолликулов супруги. Если получение спермы в день пункции невозможно, то используют предварительное получение спермы с последующим замораживанием и хранением в жидком азоте. Перед оплодотворением яйцеклетки сперматозоиды отмывают от семенной жидкости и с помощью специальных методов выделяют наиболее качественные из них.

При невозможности использования спермы мужа или при отсутствии у пациентки полового партнёра, возможно использование спермы донора. Использование спермы донора производится при обязательном письменном согласии супруга и регламентируется приказом №107н Минздрава РФ. Согласно этому приказу сперма донора используется после 6-месячного карантина, т.е. через 6 месяцев хранения в замороженном состоянии и повторного обследования донора, подтверждающего отсутствие инфекционных заболеваний.

В случаях некоторых заболеваний получение сперматозоидов возможно только изнутри яичек, поскольку в эякуляте они отсутствуют или содержатся в недостаточном количестве. Это состояние называется азооспермией. Необходимым условием при диагностике мужского бесплодия является MAR-тест (Mixed Agglutination Reaction «реакция смешанной агглютинации»). Разработаны различные хирургические методы получения/извлечения мужских половых клеток.

Два типа азооспермии (рис. 32)

Первый тип называется **обструктивной (или экскреторной) азооспермией**. Это состояние, при котором путь движения сперматозоидов **заблокирован механически**. Причинами могут служить воспалительные процессы, травмы, хирургические вмешательства, врожденные патологии. Вторым типом, называемым **необструктивной**

(секреторной) азооспермией, возникает, когда **вырабатывается очень мало мужских половых клеток**. Это может происходить при генетических нарушениях, токсических или радиационных воздействиях, эндокринных аномалиях и т.д.

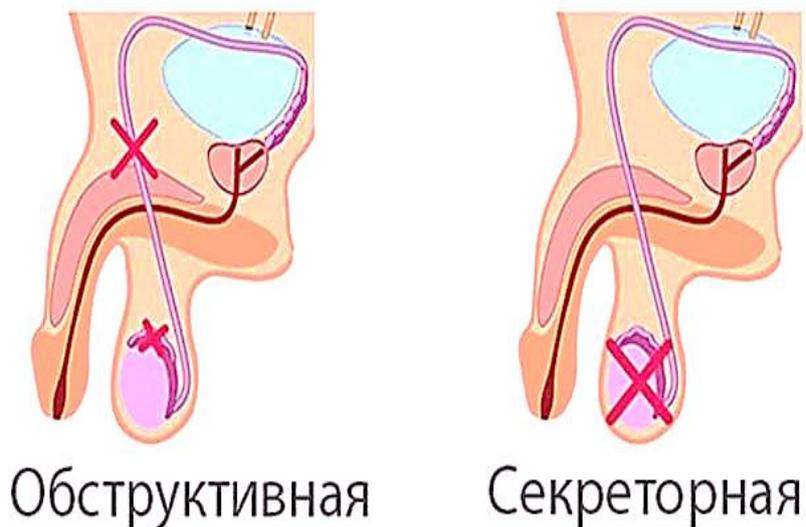


Рис. 32. Виды азооспермии
(<https://online-diagnos.ru/illness/d/azoospermiya>)

Хирургические методы получения сперматозоидов:

- TESA (метод чрескожной аспирации из яичка);
- PESA (метод чрескожной аспирации из придатка яичка);
- TESE (метод экстракции сперматозоидов из яичка);
- MESA (метод микрохирургической аспирации сперматозоидов из придатка яичка).

Оплодотворение in vitro

Непосредственно ЭКО проводится врачами-эмбриологами в условиях эмбриологической лаборатории. Собственно оплодотворение проводят одним из двух способов:

- 1) инсеминация in vitro;
- 2) интрацитоплазматическая инъекция сперматозоидов (ICSI, ИКСИ).

Инсеминация ооцитов – метод экстракорпорального оплодотворения, заключающийся в совместном культивировании ооцитов и сперматозоидов, прошедших капацитацию in vitro.

Показатели эякулята для проведения классического ЭКО

Одни специалисты ориентируются на количество подвижных сперматозоидов в нативном эякуляте (более 1×10^6), другие – на количество подвижных сперматозоидов в обработанной сперме (более

0,2×10⁶ или 0,5×10⁶), третьи – на концентрацию и морфологию сперматозоидов в нативном образце (более 0,5×10⁶ морфологически нормальных, прогрессивно-подвижных сперматозоидов в миллилитре).

Подготовка сперматозоидов для инсеминации:

- Для обработки спермы рекомендуется использовать такие методы, как центрифугирование в градиенте плотности и swim-up («всплытие»).
- Существуют альтернативные методы обработки спермы (миграция-седиментация, фильтрация через стекловолокно, магнитная сепарация, микрожидкостные камеры и др.), однако практически все они имеют существенные ограничения либо находятся на стадии апробации.
- Первым шагом является удаление семенной плазмы и других клеток с помощью центрифугирования. Затем помещают в питательную среду и оставляют на некоторое время в инкубаторе, чтобы сперматозоиды самого высокого качества двигались вверх. Это будут сперматозоиды, отобранные для лечения бесплодия.

ИКСИ (ICSI – IntraCytoplasmic Sperm Injection, интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида) – инъекция единичного сперматозоида в цитоплазму яйцеклетки, при которой не происходит обычного связывания сперматозоида с оболочкой и проникновение его внутрь.

Показания к ИКСИ

- Значительное снижение концентрации, подвижности и/или морфологии сперматозоидов.
- Использование сперматозоидов, полученных хирургическим путем.
- Использование ооцитов после криоконсервации.
- Предыдущая неудачная попытка со стандартным эко (если оплодотворилось менее 20% полученных зрелых ооцитов).
- Программы с созревaniem ооцитов *in vitro*.

Противопоказания к ИКСИ

- тяжелые психологические нарушения;
- соматические патологии;
- злокачественные опухоли, независимо от их локализации;
- онкологические болезни крови;
- анемия высокой степени тяжести;

- пороки развития матки, которые делают вынашивание плода невозможным;
- миомы матки весомых размеров, с множеством узлов или субмукозной локализацией с деформацией полости органа;
- сахарный диабет тяжелой формы;
- болезни сердечно-сосудистой или нервной системы;

Внутриматочная инсеминация (ВМИ, искусственная инсеминация) (рис. 33) – медицинская технология (вспомогательная репродуктивная технология), представляющая собой введение в цервикальный канал или матку женщины спермы мужчины, полученной заблаговременно вне полового акта.

Искусственная инсеминация

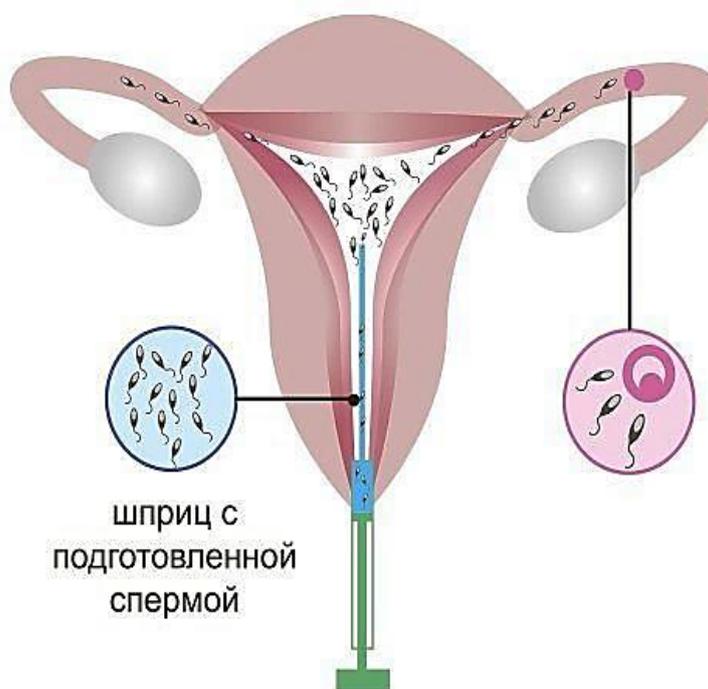


Рис. 33. Искусственная инсеминация
(<https://eko-vitalis.ru/uslugi/eko/iskusstvennaya-inseminatsiya/>)

Согласно приказу №107н Минздрава РФ определены следующие показания и противопоказания для искусственной инсеминации. Показаниями для проведения искусственной инсеминации спермой донора являются **со стороны мужчины:**

- бесплодие (например, азооспермия);
- эякуляторно-сексуальные расстройства;
- неблагоприятный медико-генетический прогноз (носительство наследственных заболеваний);

со стороны женщины:

- отсутствие полового партнёра.

Показаниями для проведения искусственной инсеминации спермой мужа являются **со стороны мужчины:**

- субфертильная сперма;
- эякуляторно-сексуальные расстройства

со стороны женщины:

- цервикальный фактор бесплодия;
- вагинизм.

После проникновения сперматозоида яйцеклетка считается эмбрионом. Вероятность успешного оплодотворения 60–70%. Эмбрионы содержат в искусственных условиях от 2 до 6 дней. Для этого используют так называемые CO₂-инкубаторы – шкафы, в которых поддерживается температура 37 °С и содержание CO₂ в атмосфере 5–6%. Эмбрионы (а до этого яйцеклетки) в инкубаторах непосредственно содержат в пластиковых чашках (чашки Петри, чашки Нунка, планшеты и пр.) с культуральной средой. В культуральную среду для эмбрионов входят основные физиологические ионы (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cl⁻, CO₃²⁻ и т.д.), энергетические субстраты (глюкоза, пируват, лактат) аминокислоты, часто витамины и белки сыворотки крови. За время инкубации эмбрион человека практически не увеличивается в размере (первые 4 дня его размер 0,1 мм, на 5 день 0,15–0,2 мм), но количество клеток, его составляющих, возрастает многократно (1 день – 1 клетка; 2 день – 4 клетки; 3 день – 8 клеток; 4 день – от 10 до 20 клеток, 5 день – от 40 до 200 клеток). Перенос эмбрионов в полость матки рекомендуется осуществлять через 48–144 ч после получения и оплодотворения ооцитов, т.е. на 2–6 сутки развития. Перенос эмбрионов рекомендуется проводить под ультразвуковым контролем, что повышает частоту наступления беременности и роды живым плодом.

Возможно применение среды, содержащей гиалуроновую кислоту, что, по данным литературы, увеличивает частоту наступления клинической беременности и родов живым плодом, для повышения вероятности наступления беременности перед переносом рекомендуется удаление слизи из цервикального канала стерильным тампоном, смоченным физиологическим раствором или питательной средой, или аспирация слизи с помощью катетера и шприца. В клинической практике допускается перенос не более двух эмбрионов. Селективный перенос

одного эмбриона рекомендуется с целью снижения риска наступления многоплодной беременности.

При принятии решения о количестве переносимых эмбрионов, рекомендуется учитывать следующие факторы: возраст женщины, состояние матки, количество и качество эмбрионов (годных к переносу), исходы предыдущих попыток. При невозможности вынашивания плода пациентка может прибегнуть к использованию **суррогатной матери**.

Дополнительные мероприятия при культивировании эмбрионов

В течение культивирования эмбрионов возможно осуществление дополнительных лабораторных мероприятий. **Криоконсервация эмбрионов** – жизнеспособные эмбрионы замораживают и хранят при температуре жидкого азота. В дальнейшем эмбрионы могут быть разморожены и осуществлен повторный перенос в матку для достижения беременности.

Показания:

1. Получение в программе ЭКО большего, чем требуется для переноса, количества эмбрионов.
2. Наличие противопоказаний, при проведении программы ЭКО, к переносу эмбрионов (синдром гиперстимуляции яичников, «низкий» эндометрий).
3. Наличие соматической патологии, при которой вынашивание беременности в настоящее время противопоказано.
4. Формирование «банка» собственных эмбрионов при низком овариальном резерве или в случае, когда планирование беременности отсрочено.
5. Планирование генетического скрининга эмбрионов.

Методика: криоконсервация эмбрионов может быть осуществлена на любой стадии развития, но наиболее эффективна криоконсервация эмбрионов в стадии бластоцисты на 5–6 сутки развития.

• Для хранения эмбрионов в криоконсервированном состоянии используются специальные устройства – «соломинки», в каждую из которых помещают 1–2 эмбриона. Длительность хранения эмбрионов в криоконсервированном состоянии может быть более 10 лет, поскольку низкая температура приостанавливает метаболические процессы в эмбрионе до периода его размораживания.

Этапы программы переноса криоконсервированных эмбрионов:

1. Подготовка эндометрия к переносу.

2. Перенос эмбриона/ов в полость матки.
3. Поддержка лютеиновой фазы цикла.

Преимплантационная генетическая диагностика (ПГД) – диагностика генетических заболеваний у эмбриона человека перед имплантацией в слизистую оболочку матки, то есть до начала беременности. Обычно для анализа проводится биопсия одного бластомера у эмбриона, находящегося на стадии дробления (4–10 бластомеров).

Показания к ПГД

- носительство родителями хромосомных и генетических заболеваний;
- не вынашивание беременности (более двух выкидышей);
- возраст мужчины старше 39 лет;
- возраст женщины старше 34 лет;
- неудачные попытки ЭКО (более двух);
- использование донорских клеток.

Преимплантационная генетическая диагностика даёт возможность узнать генетический статус эмбриона до наступления беременности и последующей необходимости прерывания при неблагоприятных результатах.

Виды преимплантационной генетической диагностики

1. ПГТ-А хромосомных аномалий. Преимплантационная генетическая диагностика эмбриона для обнаружения анеуплоидий.
2. НЕИНВАЗИВНЫЙ ПГТ-А хромосомных аномалий.
3. ПГТ-М моногенных заболеваний – преимплантационный генетический тест для обнаружения моногенных заболеваний.
4. ПГТ-SR для диагностики структурных аномалий.

Генетические методы ПГД

1. Для числовых и структурных хромосомных нарушений применяется метод FISH (флуоресцентная гибридизация *in situ*). Обычно проводится для анализа числовых нарушений трёх, пяти или семи хромосом, чаще всего хромосом 13, 18, 21, X и Y.
2. Современной альтернативой методу FISH является метод сравнительной геномной гибридизации на микрочипах. СГС позволяет протестировать все хромосомы одновременно.
3. При проведении ПГД моногенных заболеваний применяется метод ПЦР.

Показания к ЭКО по ОМС

Основанием для проведения экстракорпорального оплодотворения по полису обязательного медицинского страхования является наличие диагноза «бесплодие». Ставится он в том случае, если женщина в возрасте до 35 лет не может забеременеть в течение 12 месяцев активной половой жизни без использования средств предохранения, а в возрасте старше 35 лет – в течение 6 месяцев. ЭКО по ОМС не проводится, если к нему имеются противопоказания. Также ЭКО по ОМС не проводится, если есть следующие ограничения:

- снижение овариального резерва (уровень антимюллерова гормона менее 1,2 нг/мл, количество антральных фолликулов менее 5 суммарно в обоих яичниках) (перенос криоконсервированных эмбрионов возможен);
- состояния, при которых имеются показания для хирургической коррекции органов репродуктивной системы;
- состояния, при которых имеются показания для суррогатного материнства;
- острые воспалительные заболевания любой локализации до излечения.

Важно! Зрелый возраст женщины не является противопоказанием. В некоторых случаях прибегают к донорским яйцеклеткам. Услуга их предоставления является платной. Она оплачивается отдельно! Также к бесплатным услугам относятся:

- стимуляция суперовуляции. Протоколы и препараты назначаются врачом и также бесплатны,
- мониторинг роста фолликулов,
- пункция (забор) яйцеклетки из фолликула,
- оплодотворение яйцеклетки (*in vivo*, *in vitro*) и культивирование эмбрионов,
- подсадка (перенос оплодотворенного эмбриона в матку),
- криоконсервация эмбрионов, подсадка размороженных эмбрионов в матку,
- ИКСИ.

«Лишние» эмбрионы можно заморозить, процедура их криоконсервации бесплатна, но вот за хранение или транспортировку придется доплатить.

В бесплатные услуги ЭКО по ОМС **не входят:**

- донорские материалы,
- услуги суррогатной матери,
- генетическая диагностика эмбрионов перед подсадкой.

Заключение

По сравнению с различными новыми методами искусственного оплодотворения, ЭКО практикуется довольно давно, чтобы можно было сделать выводы о здоровье детей, зачатых таким способом. Исследования показывают, что, в большинстве случаев, у детей, зачатых при помощи ЭКО, не наблюдается каких-либо проблем со здоровьем. ЭКО дает женщинам шанс родить ребенка. Как известно, беременность наступает лишь в 30–35% попыток искусственного оплодотворения. Возникает вопрос: как быть тем 70 из 100 женщин, у которых не наступила беременность? Сколько раз можно предпринимать попытки ЭКО? В каждом отдельном случае этот вопрос решается индивидуально. Сама процедура ЭКО достаточно безопасна и может повторяться много раз. У некоторых пар беременность наступает с 8–10 попытки. Разумный предел количества процедур есть, он определяется врачом в зависимости от конкретной ситуации. При повторных попытках возможно использование эмбрионов, не использованных в предыдущий раз.

ЛЕКЦИЯ 11

ВВЕДЕНИЕ В РЕГЕНЕРАТИВНУЮ МЕДИЦИНУ

Термин «регенеративная медицина» впервые был использован в 1992 г. профессором Ларри Р. Кайзером в научной статье «Будущее многопрофильных систем». Немного позже, в 1999 г., американский биолог Уильямом Хаселтайн предложил этот термин уже в современном понимании, обосновав его как перспективное направление в области биомедицинских исследований.

Регенеративная медицина – медицинское направление по замене или регенерации клеток, тканей или органов для восстановления утраченных функций (рис. 34).



Рис. 34. Направления регенеративной медицины

Регенеративная медицина (рис. 34) является ярким примером стирания граней между фундаментальными и прикладными исследованиями, взаимодействия различных научных дисциплин. Определяющую роль данного медицинского направления играет биологическая база исследований. Регенеративная медицина является одним из главных

приоритетов современной медицины. Результатом лечения многих социально значимых заболеваний в настоящее время остается достижение ремиссии. Большинство современных лекарств способны специфично регулировать активность клеток в тканях-мишенях, активируя или подавляя ее. В своем большинстве, они не способны восстанавливать структуру тканей и органов-мишеней, измененную заболеванием. Подходы регенеративной медицины позволяют, восстанавливая структуру и функции органов и тканей, измененных заболеванием, достигать максимально возможных результатов лечения. Возможно изменение исхода лечения с хронизации и инвалидизации на полное выздоровление. Очевидно, что за счет максимально возможного восстановления исходной структуры органов и тканей будет обеспечиваться повышение качества жизни пациентов.

К основным направлениям развития регенеративной биомедицины следует отнести: исследования молекулярных механизмов регуляции процессов клеточной дифференцировки, миграции и пролиферации; выявление ключевых биологически активных молекул (факторов роста, цитокинов, физиологически активных веществ, других продуктов культивирования клеток) для стимуляции восстановления структуры и функций органов и тканей; биомедицинские клеточные и тканеинженерные продукты для замещения тканей и органов, структур организма, искусственные органы; биомедицинские препараты на основе продуктов культивирования клеток; биомедицинские клеточные и тканеинженерные продукты для стимуляции регенерации тканей, органов; использование анализа клеточных популяций для диагностики функциональных и патологических состояний организма; создание клеточных систем доставки терапевтических препаратов, в том числе противоопухолевых, и стимуляторов управляемой регенерации; научно-методические подходы перепрограммирования клеток, дифференцировки и трансдифференцировки, технологии терапевтического клонирования; биоматериалы с заданными свойствами, биополимерные носители, новые биосовместимые материалы с регулируемыми параметрами биodeградации, индуктивными свойствами; создание и развитие инфраструктуры для исследований, разработок и внедрения клеточных и регенеративных технологий.

Сложившаяся сегодня концепция физиологической регенерации предполагает наличие в организме человека компенсаторных резервов в виде тканеспецифических стволовых клеток. Целевая стимуляция стволовых клеток приводит к направленной регенерации утраченных

структур, восстановлению функций. Имеется значительный объем информации о регуляторных механизмах, факторах стимуляции пролиферации и дифференцировки столовых клеток различного типа. Возможна эффективная индукция стволовых клеток рекомбинантными факторами роста, цитокинами и специфическими матриксными белками для запуска программы восстановления структур или функций организма. Рекомбинантные белки полностью соответствуют природным регулирующим агентам, при этом генно-инженерные технологии позволяют получать их в значительных количествах с охарактеризованной структурой в функционально активном состоянии. Использование рекомбинантных факторов роста является технологическим трендом в биомедицине с 80-х годов.

Широко известен препарат эритропоэтин, являющийся фактором роста кроветворных стволовых клеток. Специфические факторы роста, цитокины и их комбинации, в том числе с матриксными белками, способны избирательно активировать различные компартменты тканеспецифичных стволовых клеток, что приведет к восстановлению тех или иных функций или структур организма. Такое воздействие является контролируемым, специфичным и дозируемым. Подход к стимуляции целевых клеток или тканей должен заменить использование неспецифических стимуляторов животного или растительного происхождения, тканевых вытяжек, экстрактов, которые не всегда поддаются характеристике и в силу этого не могут соответствовать требованиям обеспечения биобезопасности и доказательной медицины. Сегодня возможно использование специфических факторов роста для стимуляции раневого заживления, тканевого метаболизма, поддержания трофических функций, стимуляции васкуляризации, нейрогенеза, остеогенеза и др. Использование рекомбинантных факторов роста, цитокинов позволит создать линейку новых продуктов, обладающих специфическим действием, для лечения язв и трофических ран, эпителиальных повреждений, поражений роговицы, предотвращения дегенерации сетчатки, стимуляции мозговых функций, стимуляции остео- и хондрогенеза и др. Такие лекарственные средства должны быть представлены в различных формах: гели, мази, капли, назальные, инъекционные формы, комплексы с биополимерами и др. Важно, чтобы в разработке учитывались рекомбинантные факторы. Учитывая, что для стимуляции регенеративных процессов часто необходимо одновременное введение нескольких факторов роста и цитокинов, парал-

лельно с развитием российского производства факторов роста необходимо развить разработку и производство препаратов для генной терапии, основанных на генетических конструкциях, несущих гены факторов роста и цитокинов. Введение таких генетических конструкций в ткани приводит к увеличению в них продукции соответствующих факторов роста на относительно длительный период времени от 1 до 3 недель, что необходимо для обеспечения регенеративного процесса. Развитие биотехнологических производств рекомбинантных факторов для регенерации одновременно обеспечит нужды производств клеточных и тканевых продуктов, где эти агенты используются в качестве стимуляторов роста и дифференцировки клеток.

Неотъемлемой составляющей регенеративного процесса является восстановление кровоснабжения и иннервации тканей. Сегодня механизмы роста сосудов и нервов достаточно хорошо изучены, что позволяет разрабатывать методы стимуляции этих процессов на основе использования ангиогенных и нейротрофических факторов и их генов. Разработка белковых и генных препаратов, позволяющих увеличить в тканях содержание ангиогенных и нейротрофических факторов, позволит успешно стимулировать ангиогенез и рост периферических нервов, без чего невозможна полноценная регенерация.

30 июня 2012 г. в Санкт-Петербурге на 23 международной конференции «Актуальные вопросы сосудистой хирургии» состоялась презентация первого отечественного геннотерапевтического препарата **Неоваскулген**[®], разработчиком которого является российская биотехнологическая компания Институт Стволовых Клеток Человека (ИСКЧ). Неоваскулген предназначен для лечения пациентов с хронической ишемией нижних конечностей. Неоваскулоген – генноинженерная конструкция, кодирующая ФР эндотелия сосудов (рис. 35). Перспективными направлениями развития регенеративной медицины считают протеомные исследования, исследования с использованием клеточных технологий, тканевую инженерию, технологии создания биоматериалов, 3D-биопринтинг. Кроме того, периодически появляются новые направления.

Благодаря клеточным технологиям сейчас можно с успехом лечить серьезные заболевания, которые ещё недавно считались безнадежными, а исследования и медицинские разработки ведутся по самому широкому спектру проблем – от онкологии до косметологии. Клеточные технологии – это, прежде всего, стволовые клетки и клетки предшественники, которые способны поддерживать свою популяцию

и превращаться в специализированные клетки с разными функциями. Их можно выделять из различных тканей организма, культивировать, а затем либо вводить в организм, либо использовать для тканевой инженерии.

Неоваскулоген – генноинженерная конструкция, кодирующая ФР эндотелия сосудов



1 флакон
емкостью 5 мл

НЕОВАСКУЛГЕН®
По 1,2 мг для внутривенного введения

Инструкция для приготовления раствора для внутривенного введения 1,2 мг.
Раскормить в 1,2 мл воды для инъекций.
Одна флакон.

Производитель:
ИГЭР (ПАО) Фармацевтический РИ,
Россия, г. Москва,
Новый Ясеневский проезд, в. 4
тел.: (495) 812-11-83
факс: 812-40-12



СИБИРСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

Неоваскулен — первый препарат для терапевтического ангиогенеза, Препарат Неоваскулен® представляет собой высокоочищенную сверхскрученную форму плазмиды рСМV-VEGF165, кодирующую эндотелиальный фактор роста сосудов (Vascular endothelial growth factor, VEGF) под контролем промотора (управляющего участка ДНК).

порошок лиофилизированный для приготовления инъекционного раствора
1,2мг № 1
от 46 010.00 до 55 000.00 руб.



ИНСТИТУТ
СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА

Рис. 35. Препарат для терапевтического ангиогенеза

Существуют два принципиальных подхода к применению клеточных продуктов в медицине:

- **использование аутологичных клеток;**
- **использование аллогенных клеток.**

Использование **аутологичных клеточных конструкций** на основе клеток способно приводить к замещению утраченных структур. В отличие от трансплантируемых органов, такие конструкции иммуносовместимы. Перспективой клеточных технологий является разработка технологий получения всех без исключения клеток организма, пригодных для аутологичной заместительной терапии. Сегодня ряд специализированных клеточных типов не доступен для выделения и культивирования вне организма в технологических масштабах. Если мезенхимные, кроветворные эпителиальные клетки, в том числе и стволовые, могут быть выделены из тканей постнатального организма, то кардиомиоциты, нейроны, гепатоциты или клетки поджелудочной

железы не могут быть получены в достаточных количествах для перевода в культуру и масштабирования с целью последующей аутологичной трансплантации. Существующие в мире научно технологические подходы не позволяют сегодня получать критически важные специализированные клетки надлежащего качества для клинического применения. Исследования в этой области активно ведутся во многих лабораториях мира. Получение специализированных целевых иммуносовместимых клеток является главной проблемой, при этом конструирование трехмерных многоклеточных конструкций, сочетающихся с матриксом, также требует разработки оригинальных технологических решений. Тем не менее, сегодня многие клеточные продукты, полученные из клеток взрослого организма, могут быть использованы для аутологичной трансплантации и замещения дефектных тканей и органов. Более того, в ряде технологически развитых стран клеточные продукты используются уже около десятка лет.

Уникальной возможностью, открывшейся с началом использования клеточных продуктов, стала индукция регенерации **аллогенными трансплантатами**. Научная основа индукционной регенерации закладывалась с 40-х годов прошлого века, однако использование клеточных продуктов дала новый импульс этому подходу. Обладая низкой иммуногенностью, аллогенные клеточные трансплантаты могут долго сохраняться в организме реципиента, создавая условия для физиологической регенерации, обеспечивая индукцию восстановления собственных тканей. Такие трансплантаты должны стать объектом нового биомедицинского производства. Они могут нарабатываться в значительных количествах, характеризоваться и храниться в биобанках с последующим клиническим использованием. Фактически речь идет о появлении нового вида биомедицинских продуктов, отличающегося как от лекарственных средств, так и от трансплантируемых органов и тканей. Сегодня использование аллогенных клеточных продуктов имеет значительную доказательную базу, накоплен достаточный экспериментальный материал, что позволяет рассчитывать на внедрение аллогенных клеточных продуктов – костного и хрящевого трансплантата, выращенной аллогенной кожи, клеточного продукта для стимуляции ангиогенеза ишемизированных тканей, стромального трансплантата – в течение 2–3 лет, после появления соответствующей нормативно-правовой базы и определения регистрационной процедуры.

Несмотря на открывающиеся возможности клинического применения продуктов на основе постнатальных клеток человека, ряд специализированных клеточных типов недоступен для широкого применения. Необходимость получения функционально активных гепатоцитов, инсулин-продуцирующих клеток, нейронов различного типа, кардиомиоцитов, мышечных, половых и некоторых других типов клеток заставляет формулировать научные технологические подходы к получению любых специализированных иммуносовместимых клеток организма человека для терапии. Существует несколько научных подходов, одним из которых является **использование плюрипотентных столовых клеток**. Исследования в области плюрипотентных клеток являются ярким примером быстро меняющейся парадигмы научных исследований в этой области. Большие надежды были связаны с исследованиями **эмбриональных стволовых клеток**, которые, как полагали, дадут возможность решить проблему получения любых специализированных клеток организма, в том числе и иммуносовместимых, для трансплантации реципиенту. Эти исследования столкнулись с массой неразрешимых социально-этических, научных и технологических проблем и не привели к искомым результатам. Выходом казалось использование **клеток с индуцированной плюрипотентностью**, которые были получены в результате выдающегося исследования С. Яманака (2006 г.), которое в 2012 г. было отмечено Нобелевской премией.

Клетки с индуцированной плюрипотентностью могут быть получены из любых клеток человека, приобретя при этом многие характеристики эмбриональных стволовых клеток. Свойство плюрипотентности состоит в возможности дифференцировать клетки в любые специализированные типы. Таким образом, открылась возможность получать специализированные клетки индивидуально для любого пациента. Такая технология может явиться ярким примером персонафицированной медицины, поскольку клеточные продукты для замещения пораженных тканей или органов станут готовиться непосредственно для конкретного пациента из его образцов биоматериала. В результате исследований 2012 г. из клеток с индуцированной плюрипотентностью удалось получить половые клетки – яйцеклетку, а ранее сперматозоид, что открывает возможность получения вне организма оплодотворенных яйцеклеток из соматических клеток человека. Несмотря на возможность появления индивидуальных плюрипотентных клеток с последующей их дифференцировкой до специализиро-

ванных клеточных трансплантатов, их внедрение в клиническую практику сдерживается рядом серьезных обстоятельств, прежде всего, наличием у этих клеток онкогенных потенциалов. По соображениям безопасности применение клеток с индуцированной плюрипотентностью возможно только в индивидуальной медицине с целью *in vitro* диагностики особенностей патогенеза заболевания и индивидуального подбора фармакотерапии.

Открытие биофизических механизмов, влияющих на перепрограммирование, имеет огромное значение для совершенствования методов получения стволовых клеток и для разработки новых биоматериалов. Эти способы являются довольно эффективными и надежными средствами перепрограммирования клеток, которые позволяют избежать проблемы, связанные с генной инженерией. Одно из направлений генной инженерии – **таргетная терапия**. Ее методики разработаны пока лишь для лечения нескольких видов рака. Они заключаются в возможности блокировки молекул или генов, которые способствуют росту раковых новообразований и метастаз.

Таргетная терапия основана на использовании лекарств, прицельно воздействующих на биомолекулы-мишени в клетках, что стало возможным с развитием биотехнологий. Гибридные антитела или генетически модифицированные лимфоциты в онкологии могут демонстрировать более высокие показатели эффективности и обладают благоприятным профилем безопасности, нежели традиционная химиотерапия.

Существует два типа таргетной терапии:

1) **моноклональные антитела**, блокирующие специфическую цель на раковых клетках или поставляющие прямо в раковую клетку токсические вещества;

2) лекарственные препараты на основе **малых молекул**, блокирующих процесс размножения и распространения стволовых клеток.

Одним из направлений стратегии развития в области медицины назван персонализированный подход, в который входят методы профилактики, диагностики и лечения, основанные на индивидуальных особенностях пациента. Прежде всего, его генотипе, который уже используется в лечении рака груди, меланомы и некоторых сердечно-сосудистых и других заболеваний.

Персонализированная/прецизионная медицина – модель медицинской помощи, в основе которой лежит индивидуальный подход к каждому пациенту. Персонализация достигается, в том числе, за счет

ставшего доступным генетического тестирования: можно не только точнее определить причину заболевания или вероятность его развития, но и предсказать ответ на лекарственную терапию (эта область медицины называется фармакогеномикой). Персонализированная медицина опирается на три базовых компонента. Это большие информационные базы данных о пациентах и симптомах. Диагностика на молекулярном уровне, генетическое секвенирование и дальнейшая индивидуальная стратегия лечения.

Одно из перспективных направлений является **регенеративная хирургия**, концепция которой, как научной теории, была сформулирована профессором И.А. Голяницким под руководством С.И. Спасокукоцкого еще в 1922 г. Исследования показали, что методы регенеративной хирургии, в отличие от традиционных хирургических, малоинвазивны, имеют низкий риск осложнений, ускоряют сроки реабилитации и т.д. В условиях эксперимента было продемонстрировано положительное влияние аутотрансплантации полнослойного кожного лоскута (АТПКЛ) при нарушенной иннервации на группе белых крыс. В ходе исследований было доказано, что АТПКЛ способствует более интенсивному структурному и функциональному восстановлению нервных волокон после их повреждения и оказывает выраженное стимулирующее влияние на микроциркуляцию крови как в условиях сохраненной, так и нарушенной иннервации. Для реализации принципов регенеративной медицины необходимы три основных компонента: стволовые клетки (источник регенерации), факторы роста, цитокины (направление регенерации), матрикс (поле регенерации). Для достижения клинического эффекта в регенеративной хирургии не требуется присутствие всех трех составляющих. Поэтому вышеописанный метод может быть внедрен в практику уже в обозримом будущем. Он не требует создания банка материалов, наличия дополнительных фармакологических препаратов и может быть применен практически в любых условиях.

3D-биопринтинг – самое молодое направление регенеративной медицины, оформился в самостоятельную отрасль науки в 2006 г. благодаря созданию 3D-биопринтера калифорнийской компанией Organovo. С его помощью стало возможным создание органов и тканей со сложно устроенной архитектоникой. В России основные перспективные направления в области регенеративной медицины были определены научным сообществом совместно с Министерством здравоохранения в соответствии со «Стратегией развития медицинской

науки в Российской Федерации на период до 2025 г.» и совпадают с мировыми тенденциями в этой области

Стоит отметить, что развитие отечественной регенеративной медицины во многом зависело от наличия законодательной базы, регламентирующей клинические исследования и применение клеточных продуктов и технологий. Только в 2017 г. вступил в силу Федеральный закон № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах» и началась активная разработка подзаконных актов, что создало условия для развития этой отрасли науки. В связи с этим наши ученые получили возможность для активации исследований в области клеточных технологий, необходимых для разработки новых методов трансплантации стволовых клеток, создания препаратов на основе продуктов культивирования клеток и создания клеточных систем доставки лекарственных средств к органам-мишеням, генной инженерии и т.д.

ЛЕКЦИЯ 12

БИОМАТЕРИАЛЫ В ИМПЛАНТОЛОГИИ И ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Биоинженерия – одно из самых современных направлений науки, возникшее на стыке биотехнологии, физико-химической биологии, биофизики, генной инженерии и компьютерных технологий. Бурное развитие этих областей за последние годы позволило ученым перейти от простого исследования природных биообъектов к их изменению и усовершенствованию, улучшению их полезных свойств, к созданию совершенно новых биологических объектов, не существующих в природе. Среди задач биоинженерии – создание искусственных тканей, биологических конструкций, биоматериалов, белков, макромолекул, биомиметиков, новых клеточных структурно-функциональных единиц, для восстановления поврежденных органов, тканей, морфогенеза, профилактики и лечения заболеваний, не поддающихся обычным способам терапии.

Количество имплантатов, применяемых в США в год (штук):

Ортопедическая фиксация (пластины, скрепки, винты)	1 000 000
Ортопедические имплантат	1 000 000
Внутриглазные линзы	1 000 000
Спинальная хирургия	400 000
Маммологические протезы	400 000
Водители сердечного ритма	200 000
Клапана сердца	40 000

Для биоматериалов, применяемых в медицине необходимо соблюдать множество параметров, которые необходимы для долговременного существования материала в организме: биологические, биофизические, биохимические критерии. У каждого биоматериала, используемого для тканевой инженерии есть свои преимущества и недостатки. В данный момент следует выделить основные группы материалов, применяемых для изготовления клеточных матриксов: природные полимеры, синтетические полимеры, керамика, децеллюляризованные матриксы, металлы и др.

Природные (натуральные) полимеры и их мономеры

Данные материалы получают из естественных источников. Природные полимеры и их мономеры являются натуральными биоактив-

ными веществами, это в свою очередь дает им неоспоримое преимущество в адгезии, пролиферации и дифференцировке клеток на таких матриксах. Основным веществом таких материалов до 99% является вода, заполняющая полимерную сеть, поэтому такие матриксы называют еще гидрогелями, их способность впитывать воду позволяет плотно заселять их клетками и имитировать высокогидратированное состояние естественных тканей. Их структура – это структура натурального внеклеточного матрикса, что способствует повышению тканеиндуктивных свойств скаффолда, по этой причине такие полимеры представляют особую ценность для тканевой инженерии.

Коллаген – представляет собой белок внеклеточного матрикса (фибрилярный белок), коллагеновые фибриллы являются основой соединительных тканей организма и отвечают за ее прочность и эластичность. Коллаген совместно с гидроксиапатитом является основным компонентом кости и широко применяется в биомедицинских коммерческих технологиях. Путем обработки коллагена можно получить разнообразные формы матриксов: от волокнистых структур до пористых губок и гидрогелей. В то же время такие материалы имеют некоторые недостатки. Коллаген представляет собой биоразлагаемый материал с довольно высокой скоростью биodeградации. Другим недостатком является наличие пептидов с иммуногенными свойствами. Также существенным недостатком являются низкие механические свойства для выполнения долговременной каркасной функции матрикса.

При культивировании клеток во многих исследованиях используют фибрин, которые покрывают коллагеновыми белками. Коллагеновые сандвич-культуры увеличивают продолжительность жизни клеток и сохраняют их функции в долговременных культурах, в таких культурах клетки сохраняют свою функцию в течение 4–6 недель.

В последнее время для получения эквивалента хрящевой ткани применяют коллаген или гиалуронат. Матрикс насыщается либо изолированными хрящевыми клетками, либо клетками костного мозга в определенном соотношении. При введении в суставную полость данного коллагенового геля, насыщенного хондроцитами, происходило полное приживание хондроцитов через год после операции.

Другими авторами показано, что в полной мере качествами, необходимыми для матрицы, обладает коллагенсодержащий гель («Сферо[®]ГЕЛЬ», производитель ЗАО «БИОМИР сервис», Россия). СфероГЕЛЬ – коллаген тканей животного происхождения, состоит из

двух разнородных компонентов: твердого – микрочастиц гидролизата и жидкого – исходного гидролизата.

Целлюлоза – распространенный в природе полисахарид, основной компонент клеточных стенок высших растений. Как материал для тканевой инженерии имеет высокую степень гидрофильности, обладает способностью к клеточной адгезии, имеет повышенную степень прочности при растяжении, в то же время легко поддается механической обработке. Основные недостатки – за счет отсутствия у человека специфических ферментов–гидролаз обладает длительной биодegradацией, а также вследствие, высокой плотности наночастиц, заселение матрикса клетками ограничено. Сейчас применяют производные целлюлозы, устраняющие эти недостатки: карбоксиметил-целлюлозу, гидроксипропилцеллюлозу и др.

Фибронектин – структурный гликопротеин межклеточного вещества некоторых тканей. Он выполняет интегрирующую функцию межклеточного вещества и увеличивает клеточную адгезию. Преимущества фибронектина: отсутствие токсичности, контролируемая скорость биодegradации и воспалительных реакций.

Хитозан – производное хитина (раки, крабы, креветки). Ряд преимуществ хитозана: естественный полимер, не требующий жестких условий обработки, вследствие того, что растворим при $pH < 5,5$. Этот биополимер показывает хорошие противомикробные свойства и отсутствие иммунологического отторжения. Недостатком хитозана является низкий уровень механической прочности. Смесь коллагена с хитозаном в соотношении 1:1 увеличивает механические качества и уменьшает время биодegradации ($65 \pm 1,7$ дней). При засеве матрицы гепатоцитами через 25 дней они сохраняли уровень АСТ и секреции глюкозы.

Желатин – термически денатурированный коллаген. Доказано, что трехмерный желатиновый матрикс на основе различных хирургических сеток достоверно повышает способность обеспечивать адгезию и рост мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК). Показано, что желатиновое покрытие достоверно нивелирует значение состава опорной матрицы для адгезии ММСК среди образцов хирургических сеток, содержащих не рассасывающиеся нити «Prolene», «Vupro» «Ultrapro» и достоверно сохраняет гораздо большее количество клеток на хирургической сетке «Vicryl».

Альгинат, агароза – полисахариды, выделяемые из красных и бурых морских водорослей. Данные полисахариды сочетают вместе, при

этом усиливаются их механические и адгезивные свойства. Матрицы из этого вещества имеют приемлемую пористость, подходящую для клеточной миграции и доставки питательных веществ, а также показана на данных материалах с применением мезенхимальных стволовых клеток (МСК) хондрогенная дифференцировка. Из недостатков то, что биodeградация альгината и агарозы очень медленный и неконтролируемый процесс.

Гиалуроновая кислота – компонент межклеточного матрикса. Обнадеживающие результаты были получены группой исследователей при культивировании гепатоцитов *in vitro*. Затем после совместной инкубации с фибробластами на матриксе они секретировали альбумин до 14 дней.

Фиброин, спидроин – фибриллярные белки, выделенные из коконов насекомых и нитей паутины. Имеют ряд привлекательных свойств, таких как высокая степень жесткости и прочности, биodeградация, универсальны при обработке. Механические свойства и размер пор таких матриц можно изменять путем введения определенной концентрации размера частиц порообразователя и фиброина. Основным недостатком таких матриксов является низкая скорость биodeградации, которая не всегда достаточна в костной инженерии, это может исправляться путем химической модификации.

Клеточные матриксы на основе децеллюляризованной ткани

Наличие в децеллюляризованном матриксе натуральных биологически активных веществ и сохранение естественной архитектоники придает этому биоматериалу привлекательность для целей тканевой инженерии. Кроме этого для получения децеллюляризованного матрикса кости (ДКМ) требуется наличие высокоспециализированной лаборатории, а для применения в медицинских целях данного материала процесс должен иметь соответствующее юридическое сопровождение. При получении таких материалов, т.е. после обработки агрессивными веществами – концентрированными кислотами, пергидролом и т.д. поверхность материала становится невосприимчивой к адгезии культивированных клеток, вследствие этого необходимо искать способы преодоления этого с помощью различных дополнительных методов. Данный факт понижает «технологичность» процесса изготовления тканевого эквивалента. В экспериментах на животных (крысы, собаки) использование ДКМ совместно с МСК оказалось эффективным при заживлении костных дефектов теменных костей. Спустя 12 месяцев структура и целостность кости были восстановлены, по сравнению с

контролем по данным компьютерно-томографического и гистологического исследований.

Выполнено несколько клинических операций по использованию скаффолдов костной ткани у человека. В клинической практике описан случай восстановления с помощью таких конструкций дефекта костей черепа площадью около 120 см², который был получен в результате травмы с последующим развитием остеомиелита. Здесь использовали аутологичные клетки костного мозга и жировой клетчатки, которые наносили с помощью фибринового клея, приготовленного из плазмы крови пациента, на коммерчески доступный матрикс Palacos[®], состоящий из ДКМ.

Недавно для получения тканеинженерной конструкции печеночной ткани использовались скаффолды на основе децеллюляризованной тонкой кишки. В исследовательских работах описана качество матрикса печеночной ткани была донорская внеклеточная печеночная матрица. Гепатоциты засеянные на данную матрицу показали активный метаболизм с увеличением синтеза белковых молекул и оптимизацией синтеза мочевины.

По многочисленным данным материалы, полученные децеллюляризацией органов, имеют натуральное происхождение, сохранение структуры и архитектоники естественной ткани, подходят для создания функциональных единиц и прототипов целых органов. В то же время есть критерии, которые не удовлетворяют идеальным матриксам: это необходимость донора, сложности в тщательной децеллюляризации органа и как следствие иммуногенность материала, несовпадение архитектоники аллогенного трансплантата с организмом хозяина, возможность замены только мягких тканей.

Синтетические полимеры

Разнообразное количество методов синтеза и обработки данных материалов дает возможность легко получать как необходимую архитектуру, так и разнообразные физико-химические свойства матриксов. Эти полимеры имеют низкую биоактивность, что в свою очередь снижает неблагоприятное воздействие на организм. Все полимеры имеют разнообразные физико-механические, химические и биологические свойства.

Полилактид – биodeградируемый, термопластичный полиэфир. Лактид существует в виде нескольких стереоизомеров: L-лактида, D-лактида и рацемических форм LD-лактида. Полимер, полученный из L-лактида, обладает низкой скоростью биodeградации

(несколько лет). Полимер из LD-лактида является высокобиodeградируемым полимером, но его механические свойства достаточно низкие. Комбинируя концентрации сополимеров L-лактида и LD-лактида, придают полимеру необходимую механическую прочность и адекватную скорость биodeградации. Недостатками данного полимера является его гидрофобность, а, следовательно, низкая смачиваемость, что приводит к низкой проницаемости и незаполненным клетками пустым полостям. Продукты его распада приводят к локальному закислению, присутствуют воспалительные реакции при его введении в организм, при этом материал показывает недостаточную прочность при сжатии.

Показано, что имплантаты из полигидроксибутирата или его различных производных в лучшей степени поддерживают реконструктивный остеогенез и костеобразование происходит лучше при наличии таких полимеров. Такие матрицы обеспечивают нормальное протекание репаративного остеогенеза и приводят к адекватному росту новой костной ткани.

Полигликолид – линейный полиэфир, представляет собой полимер гликолевой кислоты. В тканевой инженерии костной ткани используют сополимер полилактида и полигликолида – полилактогликолид. Достоинством этого материала для использования в тканевой инженерии возможность контроля скорости биodeградации. При этом при культивировании на нем клеток он способен разлагаться на мономеры – природные метаболиты: молочную и гликолевую кислоты.

Поликапролактон – полукристаллический биodeградируемый полиэфир. Материал имеет прекрасные механические свойства, при этом легок в обработке. Недостатками являются гидрофобная структура и отсутствие биоактивных функциональных групп, что и ограничивает внедрение этого полимера в тканевой инженерии.

Поливиниловый спирт – не биodeградируемый синтетический полимер. Достоинствами данного материала считаются высокая степень гидрофильности и полупроницаемости для кислорода и питательных веществ, высокие механические свойства. При этом отсутствие биodeградации является серьезным ограничением в использовании данного полимера.

Недостатками полимеров органических кислот (полимолочной и полигликолевой) является быстрый срок резорбции, а это не всегда соответствует физиологическим особенностям регенерации кости, а также при этом происходит локальное понижение pH (закисление) токсичное для клеток.

Биокерамика, кальций фосфаты и другие неорганические соединения

Основные материалы этой группы, которые в настоящее время широко используются в тканевой инженерии это β -трикальций фосфат, гидроксиапатит и карбонат кальция. Разнообразие вариантов применения их для скаффолдов многолико: покрытия из порошков и нанопорошков, также цементы и гели.

Кальций фосфаты являются минералами, обогащенными ионами Ca^{2+} и PO_4^{4-} и основной составляющей естественного внеклеточного матрикса кости, которые обеспечивают его жесткость. Кальций фосфаты обеспечивают остеогенную дифференцировку клеток, способствуя экспрессии соответствующих генов, что в свою очередь придает сделанным из них матриксам остео индуктивные свойства. Также кальций фосфаты в тканевой инженерии могут использоваться и как адъювант, к синтетическим полимерам улучшая механические свойства конструкции или как модификатор поверхности для костных имплантатов из металлов.

Гидроксиапатит представляет собой минеральную составляющую костной ткани и как биоматериал для костной инженерии показывает высокие остеокондуктивные и остеоиндуктивные свойства. Самостоятельно для получения скаффолдов он не используется в связи с недостаточными механическими свойствами, малой скоростью биодеградации, отсутствием пористой структуры, и хрупкостью. Этот биоматериал в основном используется в качестве адъюванта для увеличения остеокондуктивных и остеоиндуктивных свойств матриксов в тканевой инженерии.

Большое распространение как резорбируемые остеопластические материалы получили композиты, состоящие из коллагена и гидроксиапатита и трикальцийфосфата, такие как «Колапол», «Гапкол» и др. Они обладают хорошими остеопластическими свойствами, имеют невысокую стоимость и технологичны при изготовлении. Недостатком является высокая скорость резорбции этих материалов, что не позволяет новообразованной костной ткани своевременно заполнять нужное пространство. Поэтому продолжительность реабилитации пациентов после операции отличается длительностью и повышается риск послеоперационных осложнений.

Трикальций фосфат или костная зола, служат источником фосфора и кальция, за счет того, что данные хим. элементы находятся в этих

биоматериалах в доступной форме для метаболизма клеток. Имеет схожие свойства с гидроксипатитом, но в противоположность ему является хорошо биodeградируемым материалом.

Широкое распространение среди других неорганических соединений в изготовлении внеклеточных матриц получили соединения различных металлов: SrO, MgO, Au и т.д. Они являются естественными неорганическими элементами костной ткани и повышают пролиферационную активность и дифференцировочный потенциал трансплантируемых в составе тканеинженерных конструкций клеток.

Биоактивные стекла – стеклокерамические поверхностно активные биоматериалы. Доказано, что имплантация биоактивных стекол приводит к образованию на поверхности этого биоматериала аморфного фосфата кальция или кристаллического гидроксипатита, что способствует формированию костной ткани. Данный материал высвобождает во внешнюю среду ионы кремния, кальция и фосфора, которые в свою очередь индуцируют остеогенез. С помощью введения определенной концентрации различных компонентов биоактивных стекол можно регулировать скорость биodeградации матриц.

Резюмируя вышесказанное можно сказать, что главными преимуществами биоматериалов из керамики и биостекла, является высокая твердость, изолирующие свойства теплоты и электричества и устойчивость к коррозии. Однако низкий уровень физико-механических свойств, в частности ломкость и хрупкость не дают им широко использоваться в конструкциях несущих знакопеременную нагрузку. Обычно биокерамика сочетается с металлами, образуя композитные материалы с усиленными механическими свойствами. При этом биологическая активность керамических имплантатов должна быть строго регулируемой, в противном случае это может вызвать чрезмерную минерализацию окружающих тканей и, как следствие, отторжение матрикса.

Металлы

Металлические материалы в качестве имплантатов применялись уже давно. До XVIII в. использовались драгоценные металлы, в основном золото и серебро (позднее также платина). В прошлом столетии в медицинской практике стали использоваться различные виды нержавеющей стали. На смену им пришли легкие титановые, высокопрочные кобальтовые и молибденовые и пластичные танталовые сплавы. С 50-х годов XX в., в медицине появились керамические материалы,

биостекло, полимеры, а также различные комбинации – композиционные материалы. В настоящее время в различных странах основное количество имплантатов составляют металлические изделия, широкое применение которых обусловлено их основными свойствами: прочностью и износостойкостью.

Металлы редко используются в виде чистого материала, а смешиваются с другими металлами, образуя сплав. Это обычно необходимо для получения необходимых свойств. Несколько факторов определяют выбор металлических сплавов в качестве биоматериалов: физические и механические свойства, износостойкость, прекрасная опорная функция и т.д. Несомненно, перспективным является возможность создания матриц с заданными свойствами и формами, даже на хирургическом столе в операционной. Тканеинженерные конструкции на основе сплавов металлов обладают высокой проницаемостью тканевыми жидкостями за счет гидрофильной поверхности самого материала. Однако традиционные металлические материалы не обладают эластичностью, присущей биологическим тканям, которая проявляется в способности не разрушаться при деформациях (несколько процентов), также в условиях вибраций и многократных нагрузок и возможностью восстанавливать исходную форму после снятия нагрузки. Знакопеременная нагрузка неотвратимо приводит к быстрому разрушению данных имплантатов из металлических материалов. Интеграция костной ткани с титаном, по мнению некоторых авторов со временем уменьшается, вероятно, за счет гальваноэлектрических реакций тканей организма. При этом увеличивается концентрация ионов титана после имплантации в крови и моче. Также значительные концентрации титана обнаруживаются в костях и легких, у некоторых авторов титан обнаруживается в паренхиматозных органах (печени, лимфатических узлах и почках). Главным и основным недостатком многих металлических сплавов является их коррозионная неустойчивость в организме реципиента.

Никелид титана

Характеристики сплавов из никелида титана

- однократный эффект памяти формы – изменение формы конструкции при нагревании;
- пластичность и прочность – способность материала подвергаться значительной деформации без разрушения;
- эффект сверхэластичности – характеризует гистерезисный возврат формы при снятии нагрузки;
- высокая смачиваемость и проницаемость характеризуют высокий

- уровень проницаемости и проявления капиллярного эффекта;
- сопротивляемость износу, сочетается с высокой износостойкостью в условиях трения и способностью сохранять размеры и форму;
 - возможность создавать различные по структуре и форме конструкции;
 - отсутствие канцерогенности, антигенности и мутагенности;
 - схожесть механической деформации с натуральными тканями (гистерезисной реакции на внешнее воздействие);
 - возможность стерилизоваться многочисленными способами без изменения функциональной способности.
 - высокая биосовместимость с тканями организма, в том числе на клеточном уровне.

Испытания на биосовместимость

Рентгенологические, морфологические и клинические исследования костных тканей и мышц в течение нескольких месяцев после имплантации (до 17 месяцев) показали, что сплавы из никелида титана биосовместимы с этими тканями. А именно:

- отсутствие канцерогенного воздействия имплантируемых конструкций из никелида титана;
- сплавы не оказывают местного и общетоксического действия на организм;
- не обнаружено признаков деструкции сплавов в течение длительного пребывания в организме (до 15 лет);
- образцы проверялись в тесте на элюэнтную цитосовместимость в питательной среде в течение 72 ч с фибробластами, при этом не выявлено признаков реактивности клеточного монослоя;
- проводились испытания сплавов на основе никелида титана с клетками на хромосомные отклонения, при выдержке в питательной среде в течение 24 ч, при этом оценивали относительный рост клеток, их митотический индекс. Данные, полученные в группах с образцами из никелида титана, не имели достоверных различий от контроля;
- для проверки биосовместимости материалов были также использованы тесты на аллергенность, при этом, вводили физиологический раствор, с проинкубированными в нем в течение 72 ч образцов из никелида титана;
- внутривенно и внутрикожно. Тестировалось количество микроядер в клетках костного мозга мышей, соотношение полихроматических и нехроматических клеток костного мозга, индукцию эритемы и

отека, оценивали внутрикожную реактивность, суммарный итог раздражения, сенсибилизацию кожи, подсчитывали индекс главного раздражения, оценивали острую системную токсичность по регистрации веса и биологических симптомов;

– тест на генотоксичность образцов проводили на популяции *Salmonella typhimurium*, а также использовали фибробласты линии V79 китайского хомяка. Мутационный индекс был меньше или сравним с контролем.

В настоящее время для хирургических имплантатов в основном применяют сплавы кобальта, тантала, титана, чистые металлы – никель, серебро, титан, хромоникелевые и хромоникельмолибденовые коррозионностойкие стали. В современной стоматологии в зубные имплантаты изготавливаются из титана и его сплавов, поскольку титан, как принято считать, является коррозионностойким материалом. Металлические материалы, применяемые в медицине, характеризуются защитной оксидной пленкой, которая обуславливает их высокую коррозионную защищенность и стойкость в биологических средах. При этом все металлы подвергаются коррозии под воздействием жидкостей человеческого организма. Существует ошибочное мнение о высокой коррозионной устойчивости таких металлических матрикс, как титан, тантал, нержавеющая сталь и т.д., так как исследования коррозионной устойчивости материалов проводятся в статических условиях, когда они не испытывают деформационного воздействия. В условиях гистерезисного поведения тканей оксидная пленка разрушается, не выдерживая больших знакопеременных деформаций тканей. При повреждении этого защитного слоя, коррозия усиливается в несколько десятков раз. Показано, что после пластической деформации образца из титана свыше 0,5% наблюдается резкое увеличение активности процесса коррозии, который сопровождается резким уменьшением веса испытуемого образца. Аналогичным образом ведут себя образцы из нержавеющей стали и другие традиционные металлические материалы, используемые в медицине (Co–Cr–Mo, тантал). Что касается сплавов на основе никелида титана типа ТН–10, то вплоть до 4–6% деформации пластического течения материала не происходит, следовательно, и коррозионные процессы не идут в отличие, например, от титана (рис. 36).

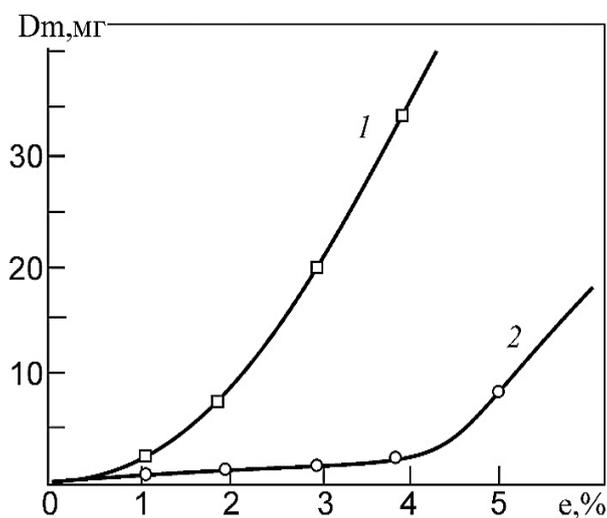


Рис. 36. Влияние степени деформации на коррозионные свойства Ti (1) и TiNiMo (2)

(<https://www.researchgate.net/publication/237097271> Problems of metals biocompatibility)

Из многих существующих металлических имплантатов гистерезисным поведением при температуре тканей организма обладают сплавы на основе никелида титана ТН-10 (TiNiMoFe). Материалы разработаны в НИИ Медицинских материалов (г. Томск), с учетом обязательного проявления гистерезисной зависимости в соответствии с поведением тканей при температурах от 30 до 40 °С. Гистерезисный характер поведения сплавов на основе никелида титана типа ТН-10 при температуре +36 °С соответствует гистерезисной запаздывающей реакции тканей. Корректировка ширины гистерезиса и величины обратимой деформации может осуществляться изменением состава сплава ТН-10 и термомеханической обработкой. Поэтому для соответствующих тканей с определенной шириной гистерезиса и величиной деформации необходимо подобрать сплав на основе ТН-10 с заданными параметрами ширины гистерезиса и величины обратимой деформации. На рисунке 37 показано соответствие деформационной зависимости сплава ТН-10 поведению биологических тканей при нагрузке и ее снятии. Также отмечено несоответствие данного параметра у таких материалов, как титан, нержавеющая сталь, тантал и др.

В сверхэластичном состоянии никелидтитановый сплав имеет оптимальное сочетание удельного веса, прочности и пластичности, износо- и циклоустойкости, значительное сопротивление усталости. На рисунке 38 представлено поведение сплава ТН-10 на основе никелида титана в сравнительных условиях поведения с тканями организма при

температуре 36–37 °С. Отмечено, что кривые нагружения и последующей разгрузки не совпадают, образуя типичную петлю гистерезиса, ширина которой определяется величиной диссипации энергии.

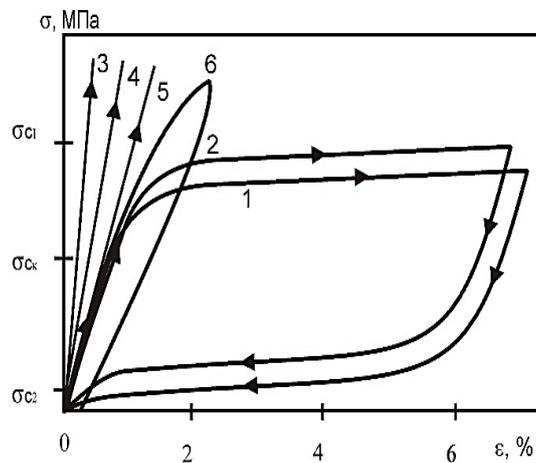


Рис. 37. Деформационные зависимости в условиях нагрузки и разгрузки искусственных материалов и биологических тканей (качественные зависимости)

Примечание: 1 – биологическая ткань (кость, коллаген, хрящ); 2 – сплав ТН-10; 3 – нержавеющая сталь; 4 – тантал; 5 – титан; 6 – полимеры
(<https://www.researchgate.net/publication/237097271> Problems of metals biocompatibility)

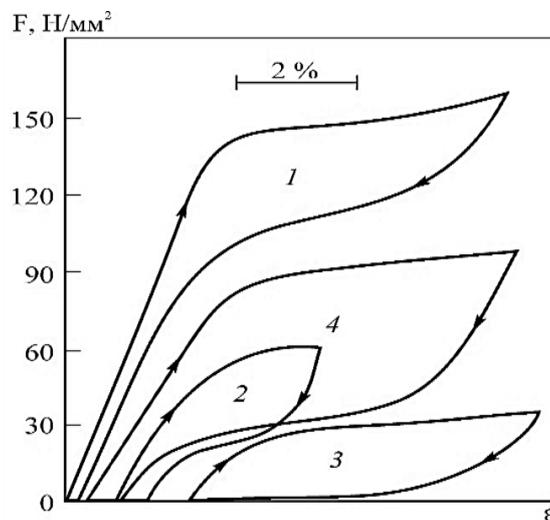


Рис. 38. Сравнительные деформационные зависимости

Примечание: 1 – волос; 2 – живая костная ткань; 3 – коллаген; 4 – сверхэластичный сплав ТН-10

(<https://www.researchgate.net/publication/237097271> Problems of metals biocompatibility)

Разнообразие применяемых полуфабрикатов из никелида титана представлено на рисунке 39 (монокристаллические структуры, пористые структуры, волокнистые структуры (нити, сетки), мелкогранулированный порошок).

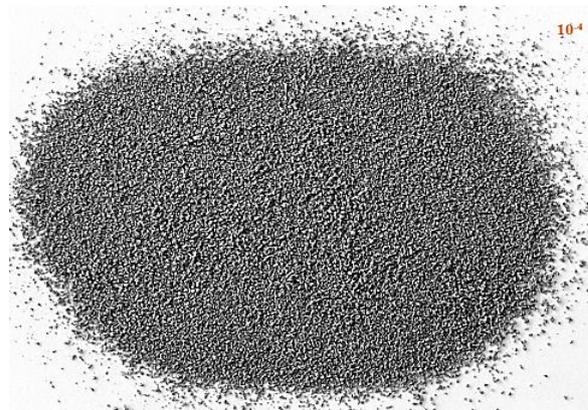
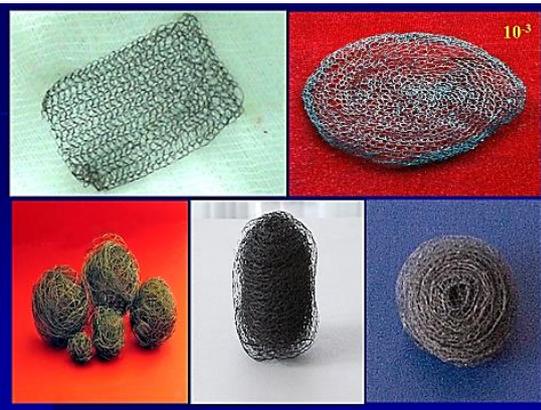


Рис. 39. Разнообразие применяемых полуфабрикатов из никелида титана (https://docviewer.yandex.ru/view/10302173/?page=34&*=VDlaa%2B9d3ZZY6HJUtePvd%2FzZOPR7InVybCI6Imh0dHBzOi8vdml0YWwubGliLnRzdS5ydS92aXRhbC9hY2Nlc3Mvc2VydmljZXMvRG93bmxvYWQvdnRsczowMDA0NjExNDYvU09VUkNFMSIsInRpdGxIjoiU09VUkNFMlSIm5vaWZyYW11Ijp0cnVILCJ1aWQiOiIxMDMwMjE3MyIsInRzIjoxNjY0NzYwOTE3MzAwLkCJ5dSI6Ijc5NTE0ODQ5NjE2NDE4ODEzOTkiLCJzZXJwUGFyYW1zIjoidG09MTY2NDc2MDkwNyZ0bGQ9cnUmbGFuZz1ydSZuYW11PVNPNVJDRTEmdGV4dD0lRDAIQkMIRDAIQjUIRDAIQjQIRDAIQjglRDEIODYIRDAIQjglRDAIQkQIRDEIODEIRDAIQkEIRDAIQjglRDAIQjUrJUQwJUJDJUQwJUlwJUQxJTgyJUQwJU11JUQxJTgwJUQwJU14JUQwJUlwJUQwJUJCJUQxJThCKyVEMCVCOCSlRDAIQjglRDAIQkMIRDAIQkYIRDAIQkIIRDAIQjAIRDAIQkQIRDEIODEIRDAIQjAIRDEIODEIIRDEIOEIRJUQxJTgxKyVEMCVCRiVEMCVCMCVEMCVQyVEMSU4RiVEMSU4MiVEMSU4QyVEMSU4RSsIRDEIODQIRDAIQkUIRDEIODAIRDAIQkMIRDEIOEIRJUQwJU1zJUQxJThFJUQwJUJEJUQxJTgyJUQwJU11JUQxJTgwJnVybD1odHRweyUzQS8vdml0YWwubGliLnRzdS5ydS92aXRhbC9hY2Nlc3Mvc2VydmljZXMvRG93bmxvYWQvdnRscyUzQTAwMDQ2MTE0Ni9TT1VSQ0UxJmxyPTY3MjEpbWU9cGRmJmwxMG49cnUmc2lnbj1lZDMwMWM3NmY2YmJlMzBlY2NiMGdwMDY5MTBkYWE4MSZrZXlucz0wIn0)

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Орехов, С. Н. Фармацевтическая биотехнология / С. Н. Орехов. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 384 с. – ISBN 978-5-9704-2499-5. – Текст: электронный // ЭБС «Консультант студента»: [сайт]. – Режим доступа: <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970424995.html>
2. Фармацевтическая биотехнология: руководство к практическим занятиям / С. Н. Орехов [и др.]; под ред. А. В. Катлинского. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 432 с. – ISBN 978-5-9704-3435-2. – Текст: электронный // ЭБС «Консультант студента»: [сайт]. – Режим доступа: <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970434352.html>
3. Дыхан, Л. Б. Основы биологической безопасности [Электронный ресурс]: учебное пособие / Дыхан Л. Б. – Ростов н/Д: Изд-во ЮФУ, 2018. – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785927530625.html>
4. Трансплантология и искусственные органы [Электронный ресурс]: учебник; под ред. С. В. Готье. – Москва: Лаборатория знаний, 2018. Режим доступа: <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785001015772.html>
5. Джайн, К. К. Основы персонализированной медицины: медицина XXI века: омикс-технологии, новые знания, компетенции и инновации [Электронный ресурс] / К. К. Джайн, К. О. Шарипов – М.: Литера, 2020. Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785423503437.html>
6. Практикум по медицинским биотехнологиям с основами молекулярной биологии: учебное пособие / В. Ю. Серебров, Е. В. Кайгородова, Н. В. Юнусова [и др.]; под редакцией В. Ю. Сереброва. – Томск: Изд-во СибГМУ, 2017. – 55 с. – Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. – Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/113508>
7. Практикум по молекулярной биологии: учебное пособие / Н. В. Юнусова, Д. И. Кузьменко, Е. В. Кайгородова [и др.]. – Томск: Изд-во СибГМУ, 2017. – 65 с. – Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. – Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/113509>

8. Кони́чев, А. С. Практикум по молекулярной биологии / А. С. Кони́чев, И. Л. Цветков, А. П. Попов [и др.]. – Москва: КолосС, 2012. – 151 с. (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. Заведений) – ISBN 978-5-9532-0815-4. – Текст: электронный // ЭБС «Консультант студента»: [сайт]. – Режим доступа: <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785953208154.html>

Учебное издание

**Наталья Валерьевна Юнусова,
Евгения Викторовна Кайгородова,
Олег Викторович Кокорев,
Рамиль Ринатович Салахов**

**МЕДИЦИНСКИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ
С ОСНОВАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ
(ИЗБРАННЫЕ ЛЕКЦИИ)**

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

Редактор Коломийцев А.Ю.
Технический редактор Коломийцева О.В.
Обложка Гончаров С.Б.

Издательство СибГМУ
634050, г. Томск, пр. Ленина, 107
тел. +7 (3822) 901–101, доб. 1760
E-mail: otd.redaktor@ssmu.ru

Подписано в печать 14.06.2023

Формат 60×84 $\frac{1}{16}$. Бумага офсетная.

Печать цифровая. Гарнитура «Times». Печ. л. 8,9. Авт. л. 6.

Тираж 100 экз. Заказ № 22

Отпечатано в Издательстве СибГМУ
634050, Томск, ул. Московский тракт, 2
E-mail: lab.poligrafii@ssmu.ru