**Клеточная инженерия**

Клеточная инженерия - совокупность методов, используемых для конструирования новых клеток. Включает культивирование и клонирование клеток на специально подобранных средах, гибридизацию клеток, пересадку клеточных ядер и другие микрохирургические операции по «разборке» и «сборке» (реконструкции) жизнеспособных клеток из отдельных фрагментов.

Начало клеточной инженерии относят к 1960-м гг., когда возник метод гибридизации соматических клеток. К этому времени были усовершенствованы способы культивирования животных клеток и появились способы выращивания в культуре клеток и тканей растений. Соматическую гибридизацию, т. е. получение гибридов без участия полового процесса, проводят, культивируя совместно клетки различных линий одного вида или клетки различных видов. При определённых условиях происходит слияние двух разных клеток в одну гибридную, содержащую оба генома объединившихся клеток. Удалось получить гибриды между клетками животных, далёких по систематическому положению, напр. мыши и курицы. Соматические гибриды нашли широкое применение как в научных исследованиях, так и в биотехнологии. С помощью гибридных клеток, полученных от клеток человека и мыши и человека и китайского хомячка, была проделана важная для медицины работа по картированию генов в хромосомах человека. Гибриды между опухолевыми клетками и нормальными клетками иммунной системы (лимфоцитами) – т. н. гибридомы – обладают свойствами обеих родительских клеточных линий. Подобно раковым клеткам, они способны неограниченно долго делиться на искусственных питательных средах (т. е. они «бессмертны») и, подобно лимфоцитам, могут вырабатывать моноклональные (однородные) антитела определённой специфичности. Такие антитела применяют в лечебных и диагностических целях, в качестве чувствительных реагентов на различные органические вещества и т. п.

При гибридизации соматических клеток растений их предварительно освобождают от плотной клеточной оболочки, а затем проводят слияние изолированных протопластов. В этом случае, как и при гибридизации клеток животных, также удаётся преодолевать барьеры нескрещиваемости, которые существуют при обычной (половой) гибридизации растений разных видов и родов. Из гибридной растительной клетки на специальной среде можно вырастить клеточную массу – каллюс, дифференцирующуюся в нормальное целое растение с корнями, стеблями и т. д. Такое гибридное растение можно высадить в землю и выращивать и размножать обычными способами. Эти методы, в отличие от традиционных, позволяют сравнительно легко и быстро получать достаточное количество генетически разнообразного исходного материала для селекции. Их применение привело, напр., к увеличению урожайности ряда культур – картофеля, цитрусовых и др.

Другое направление клеточной инженерии – манипуляции с безъядерными клетками, свободными ядрами и другими фрагментами, сводящиеся к комбинированию разнородных частей клетки. Эти эксперименты, а также микроинъекции в клетку хромосом, красителей и т. п. проводят для выяснения взаимных влияний ядра и цитоплазмы, факторов, регулирующих активность генов, и т. п.

Путём соединения клеток разных зародышей на ранних стадиях их развития выращивают мозаичных животных, или химер, состоящих из двух различающихся генотипами видов клеток. С помощью таких экспериментов изучают процессы дифференцировки клеток и тканей в ходе развития организма.

Ведущиеся уже не одно десятилетие опыты по пересадке ядер соматических клеток в лишённые ядра (энуклеированные) яйцеклетки животных с последующим выращиванием зародыша во взрослый организм с кон. 20 в. получили широкую известность как клонирование животных.

Преимущество клеточной инженерии в том, что она позволяет экспериментировать с клетками, а не с целыми организмами. Последнее гораздо сложнее, а иногда и невозможно, особенно в случае млекопитающих животных и человека или при получении отдалённых гибридов. Методы клеточной инженерии в медицине, сельском хозяйстве или биотехнологии часто применяют в сочетании с генной инженерией.

**Клеточная терапия**

Клеточная терапия используется в регенераторной медицине наравне с тканевой инженерией. КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ основана на выделении из организма специфических клеток, придании им in vitro (с помощью генетического конструирования или ряда сигнальных молекул) необходимых свойств и последующем введении в организм in vivo. Иными словами, клеточная терапия строится на основе инженерии, предусматривающей введение в клетку или удаление из нее конкретного гена.

Генетические (инженерные) манипуляции осуществляются с помощью методов молекулярной биологии, с использованием физического воздействия на наследственный материал человека. В результате такого воздействия происходит восстановление функции дефектного гена или внедрение нового гена, который добавляет клетке-мишени новые функции либо регулирует в ней активность других генов.

Потенциальный успех клеточной инженерии зависит от способности гена адекватно функционировать в клетке. Известны два подхода по доставке гена в клетку: вирусные и невирусные векторы; предварительное выделение клеток (лимфоциты, фибробласты, стволовые клетки), в которые вводится необходимый ген. После этого клетки наращиваются, тестируются и поставляются пациенту обратно.

Главными инструментами клеточной инженерии являются дендритные клетки и стволовые клетки (СК).

**Дендритные клетки**

Дендритные клетки (DCs-клетки) обладают способностью представлять антигены наивным Т-лимфоцитам и таким образом участвуют в определении направленности иммунных реакций (модулируют их) при опухолях, аутоиммунных и инфекционных заболеваниях.

Кроме того, DCs-клетки являются векторами и мишенями для изменения иммунного статуса организма.

Впервые DCs-клетки (в коже) описаны П. Лангергансом в 1868 г. Они представляют собой крупные клетки неправильной формы с ветвящимися отростками, проникающими между другими клетками, имеют хорошо развитый аппарат Гольджи, содержат в своей цитоплазме большое количество везикул с овальной и неправильной формой ядер и обнаруживаются во всех тканях организма, где обычно представляют небольшой клеточный пул. В качестве антигенпрезентирующих DCs-клетки стали объектом изучения только спустя 105 лет - в 1973 г.

Выделено несколько популяций DCs-клеток, изучены их морфология и экспрессия в них молекулярных маркеров, а также функции, зависящие от стадии развития клеток, уровня их активации и степени дифференцировки.

В развитии DCs-клеток выделены следующие стадии.

• Первая стадия - предшественники клеток костного мозга или небольшая фракция CD34+кроветворных клеток, присутствующая в костном мозге и периферической крови.

• Вторая стадия - предшественники DCs-клеток, циркулирующие в крови и лимфе; дают начало незрелым тканевым DCs-клеткам; их две субпопуляции, составляющие около 1% мононуклеарных клеток крови.

- А. Экспрессирующиеся маркеры миелоидных клеток, созревающие в ответ на воспалительные стимулы (например, в ответ на липополисахарид или TNF-альфа) - это DCs-клетки 1-го типа, происходящие либо из CD14+-моноцитов, либо из CD11c+- клеток. Они дифференцируются в незрелые DCs-клетки и макрофаги, дают начало эпидермальным клеткам Лангерганса и интерстициальным DCs-клеткам, известным также под названием тканевых DCs-клеток (дермальные клетки и макрофаги), которые локализуются в дерме и большинстве внутренних органов, включая легкие и сердце, где экспрессируют множество разных факторов.

- Б. Лимфоидные DCs-клетки 2-го типа, IF-N альфапролиферирующие клетки, созревающие в ответ на IL-13 и CD40L.

• Третья стадия - незрелые антиген-захватывающие DCs-клетки. Они располагаются в разных тканях, где разными путями захватывают антигены (макропиноцитоз, рецептор-опосредованный эндоцитоз, фагоцитоз, через TLRS-рецепторы и поверхностные рецепторы).

• Четвертая стадия - зрелые антиген-представляющие DCs- клетки. Они мигрируют во вторичные лимфоидные органы через высокий эндотелий венул лимфатических узлов или поступают непосредственно из кровяного русла.

В настоящее время описаны методики выделения и культивирования дендритных клеток из кожи, миндалин, печени, селезенки и крови. Проблемы и перспективы использования DCs-клеток при наследственной патологии имеют свои особенности.

Остановимся на особенностях иммунотерапии онкологических заболеваний с помощью дендритных клеток.

Первая особенность - важность выбора оптимального антигена, против которого следует вызвать иммунный ответ. Дендритные клетки способны мигрировать через ткани и проникать в опухоль, где захватывают опухоль-специфические антигены, переваривают их и реэкспрессируют для эффективной индукции клеточноопосредованного иммунного ответа.

Вторая особенность - DCs-клетки, как правило, применяются для терапии некурабельных больных, имеющих множественные метастазы и не поддающихся лечению традиционными методами. Например, использование DCs-клеток показано при В-клеточной лимфоме, меланоме, раке грудной железы, легких, поджелудочной железы, простаты, толстого кишечника и яичника, почечноклеточном раке.

Кроме того, имеются данные о широком использовании генетических вакцин на основе DCs-клеток при опухолях ЦНС.

**Стволовые клетки**

После выделения в 1998 г. потенциально плюрипотентных (многофункциональных) СК в регенераторной медицине открылись новые горизонты для их широкого применения. Известны два типа СК: эмбриональные (ЭСК) и соматические (ССК). И те, и другие имеют как преимущества, так и недостатки.

В частности, ЭСК - это, с одной стороны, возможность бесконечной пролиферации симметричным делением, выраженная клоногенность и плюрипотентность.

С другой стороны, ЭСК - это иммунологическая несовместимость при пересадке реципиенту, множество этических проблем (см. ниже), невозможность обнаружения генетических дефектов до их пересадки, несоответствие условий клеточной дифференцировки in vivo и in vitro, отсутствие убедительных доказательств эффективности и безопасности применения.

В свою очередь, ССК - это, с одной стороны, легкая идентификация и выделение из периферической крови и костного мозга взрослых пациентов, а также из пуповинной крови новорожденных младенцев, отсутствие этических проблем, пластичность или мульти- и унипотентность, способность поддерживать дифференцировку в тканях взрослого организма в течение всей жизни, хорошее сохранение при лабораторных манипуляциях.

С другой стороны, ССК - это малочисленная популяция недифференцированных клеток, обнаруживаемых в дифференцированных специализированных тканях, низкий пролиферативный потенциал с асимметричным делением, ограниченная способность к росту в культуре. Кроме того, для ССК нет стандартных методов длительного поддержания и коммитирования (преобразования) из дифференцированных тканей в зрелые клетки других тканей, нет надежных маркеров для их идентификации в разных тканях.

В последние годы большие надежды связаны со стволовыми гемопоэтическими клетками, которые используются в качестве клетокмишеней в 40% случаев клеточной терапии на основе ССК, ибо эти клетки способны к самоподдержанию, что снижает риск элиминации гена, введенного с их помощью.

Определенные надежды связаны с другой разновидностью ССК - миобластами: ими предполагается лечить наследственные миопатии.

**Тканевая терапия**

Тканевая инженерия является основным инструментом экзогенного управления молекулярными процессами в разных тканях. Разработка и внедрение ее методов стали необходимыми для понимания тонких механизмов клеточной дифференцировки, пролиферации и миграции, а также функционирования тканей.

Отметим, что сначала в молекулярной медицине появились возможности для понимания механизмов, регулирующих метаболизм внеклеточного матрикса. При этом учитывались особенности межклеточных и клеточно-матриксных взаимодействий и их роль в поддержании гомеостаза и целостности ткани. И именно эти особенности стали основой для разработки комплексных клеточных биоматриксных систем вне организма - тканевых эквивалентов. Благодаря параллельному развитию молекулярной медицины, биотехнологий, химии полимеров и разработке инженерных принципов конструирования тканевых эквивалентов удалось создать трехмерные функциональные анатомические единицы, обусловившие появление и развитие тканевой инженерии, использующей для замены поврежденных (пораженных) тканей и органов их инженерные аналоги.

Новые инженерные конструкции построены с учетом принципов и методов, позволяющих восстанавливать, поддерживать и улучшать функции пораженных тканей и органов.

Показано, что новая инженерная ткань хорошо интегрируется в организм пациента, осуществляя в нем постоянное специфическое лечение. Сегодня при создании новых инженерных тканей применяется множество подходов. Рассмотрим основные из них.

Первый подход - это дизайн и выращивание ткани in vitro с последующей ее имплантацией для восстановления или замены поврежденной ткани (например, пересадка компонентов кожи при лечении ожогов или введение кожных эквивалентов, восстанавливающих эпителиально-стромальные дефекты с помощью добавления культивированных фибробластов дермы, растущих в трехмерном коллагеновом геле).

Стандартной клеточной моделью кожи человека служит двухмерная клеточная система, представленная дермальным эквивалентом (это кожные фибробласты, растущие в трехмерном коллагеновом геле) и эпидермальным эквивалентом (это кератиноциты, дифференцирующиеся на поверхности дермального эквивалента).

Данная модель широко используется в биологии, дерматологии (лечение инфекционно-аллергических болезней кожи), косметологии (апробация косметических средств), офтальмологии (реконструкция роговицы глаза для восстановления специализированного покрова), травматологии и хирургии (заживление ран), трансплантации (пересадка кожи), фармакологии (доклиническая апробация лекарств).

Второй подход - это имплантация клеток, содержащих молекулы и белковые факторы, индуцирующие репарацию (см. главу 11) или регенерацию функций поврежденной ткани.

Этот подход основан на технике выделения клеток, добавлении к ним определенных сигнальных молекул (подобных факторам роста) и переносе этих клеток в биоматериалы, обеспечивающие регенерацию тканей (например, добавление стимуляторов роста костной ткани при болезнях периодонта в стоматологии).

Третий подход - это использование внутреннего потенциала тканей и органов для восстановления поврежденных функций. Этот подход основан на технике выделения СК, которые имплантируются пациенту либо непосредственно в суспензии, либо в структурном матриксе, либо после преобразования in vitro.

Четвертый подход - это метод культивирования клеток на микроносителях. Данный метод был разработан с целью оптимизации (модификации) технологии выращивания клеток и увеличения сроков жизни трансплантата (инженерной ткани). К микроносителям относятся коллагеновые микросферы, поверхности пленок разного биохимического состава, пересаживаемые на поврежденные участки кожи.

В настоящее время одной из трудноразрешимых проблем тканевой инженерии является ограниченность выбора субстрата (клеточного источника) из, казалось бы, широкого спектра материалов, перспективных для тканевой инженерии.

Среди таких материалов:

• биосовместимые и биодеградируемые (биорезорбируемые) синтетические полимеры;

• макромолекулярные полимеры, например гиалуроновая кислота, стабилизированная бензиловой этерификацией;

• модифицированные полунатальные природные соединения;

• природные полимеры (гликопротеиды, полисахариды);

• целостные ткани для восстановления хряща и роговицы. Следует отметить, что самым доступным клеточным субстратом для человека оказалась богатая белками плазма крови, например адгезивный субстрат из тромбина и фибриногена, стабилизированный протеазным ингибитором - апротинином.

Другая трудная проблема тканевой инженерии состоит в том, что применение того или иного подхода имеет свои «за» и «против». Например, на безусловную неоспоримость выбора аутогенного источника указывает отсутствие на него иммунной реакции организма, хотя при этом возможен риск инфицирования.

Наоборот, лимитирующими факторами могут стать соматические болезни пациента, его возраст, отсутствие возможности получения от него адекватного биологического материала (необходимое количество аутологических клеток).

**Нанотехнологии, нанобиотехнологии и наномедицина**

Слово «нано» происходит от греческого «гном», «карлик». Сначала рассмотрим нанотехнологии: их объекты - объекты нанометрового размера в пределах от микро до ультра-, от 10-3 до 10-18 м. Аттомолярный уровень начинается от 10-18 м.

НАНОТЕХНОЛОГИИ оперируют нанообъектами (наноматериалами), к которым относятся: биологические мембраны, жидкие кристаллы, липосомы, мицеллярные системы и микроэмульсии, надмолекулярные ансамбли и конструкции, нанокомпозиты, нанотрубки, пористые материалы, тонкие пленки и поверхностные слои, ультрадисперсные порошки, фотонные кристаллы, фуллерены.

Применение нанотехнологий и наноматериалов - это новые возможности в электронике, химии, энергетике, биологии, медицине, сельском хозяйстве и других отраслях.

В свою очередь, биомолекулярные нанотехнологии, НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ - это новое направление в биологической науке, позволяющее анализировать живые системы на молекулярном уровне с помощью наночастиц.

Переход от «микро» к «нано» - это не количественный, а качественный переход от манипуляции отдельным химическим веществом до манипуляции его молекулами и атомами. Благодаря своим «ультрамикроскопическим» размерам наночастицы приобретают новые физико-химические свойства и функции, существенно отличающиеся от тех функций, которыми обладают микрочастицы и составляющие их молекулы и атомы, т.е. частицы большего размера.

Нанобиотехнологии - это связующее звено между живой и неживой материей и возможность для создания нанобиоустройств, позволяющих понять малые компоненты живого и неживого и оценить их важную роль в функционировании клетки и организма. Неудивительно, что на основе нанобиотехнологий появилась и стремительно развивается наномедицина.

Направления развития наномедицины

Чем привлекательна наномедицина, какое значение она имеет для молекулярной медицины? Во-первых, это новая эпоха развития молекулярной медицины, это ее дальнейший путь (уровень) развития, путь перехода к медицине субмолекулярной, атомной и субатомной, т.е. медицине ближайшего будущего, идущей на смену существующей медицине и связанной с внедрением в практику ранее неизвестных врачу нанобиотехнологий, разрабатываемых с целью эффективной диагностики и лечения наследственных и ненаследственных болезней человека. Во-вторых, это создание атомно-силовых, оптикобиосенсорных, нанопроводных и нанопоровых подходов и методов диагностики, диагностических наноматериалов, позволяющих значительно повысить чувствительность, точность и существенно сократить время диагностики разных заболеваний. В-третьих, это новые возможности для постоянного и выборочного наблюдения (слежения), исправления, конструирования и контроля за управлением биологическими субмолекулярными и ультрамолекулярными системами человека, формирующими физические и химические реакции, происходящие на геномном и протеомном уровнях организации живой материи. В-четвертых, это проникновение в почти не изученную область организации неживой материи, которая, безусловно, оказывает значительное влияние на геномное и протеомное здоровье человека. В-пятых, это использование наноустройств, наноструктур и наночастиц с терапевтическим действием, способных выполнять сложнейшие микрооперации в клетках и тканях: от обнаружения и мониторинга поведения патологических генов (микроорганизмов) до их уничтожения, а также восстановления наследственного материала поврежденных клеток и тканей, обеспечения необходимыми веществами и придания им ряда других функций.

В настоящее время выделен ряд направлений развития нанобиотехнологий, связанных с наномедициной. Разрабатываются:

• нанодиагностикумы или нанобиосенсоры в диагностике (наноаналитическая геномика и протеомика);

• молекулярные нанополупроводные и нанопоровые детекторы в диагностике, счетчики молекул и сиквенс-анализаторы ДНК;

• наночастицы - контейнеры для доставки лекарств и наночастицы - лекарства;

• синтетический геном на основе молекулы ДНК как самовоспроизводящейся системы;

• нанотехнологии в регенеративной медицине;

• медицинские нанороботы, имитирующие функции разных клеток.

Кратко рассмотрим особенности некоторых из этих направлений.

Нанодиагностикумы и нанобиосенсоры

Существующий в протеомике концентрационный барьер для обнаружения и идентификации белковых молекул в биологическом материале составляет 10-12 м (1 нм = 10-9 м), тогда как методы радиоиммунного анализа (РИА) и иммуноферментного анализа (ИФА) имеют чувствительность 10-12-10-15 м.

Дальнейшее развитие протеомики определяется разработкой и внедрением методов идентификации белковых молекул в диапазоне концентраций от 10-3 до 10-20 м. Причем такая чувствительность должна достигаться в многокомпонентном биологическом материале, содержащем сотни тысяч разных белков.

Показано, что использование нанотехнологий при применении электрофоретического и хроматографического методов разделения белков позволяет снизить объем исследуемого материала на несколько порядков и существенно сократить время для его анализа.

Например, с помощью наноэлектрофореза разделение сложной смеси на 20 белков с молекулярной массой от 10 до 100 кДа осуществляется всего за 15 с, а при проведении стандартного 2D-электрофореза - несколько часов.

Одним из способов выделения и концентрирования белков из сложных смесей стал их селективный захват и концентрирование на поверхности нанобиочипов за счет межмолекулярных взаимодействий, а также за счет биосенсоров на основе биоспецифического фишинга. Эти методы позволяют выделять в биологической жидкости белки с низкой концентрацией и одновременно повышать их концентрацию с последующей идентификацией на масс-спектрометре LC/MS. При этом чувствительность достигает аттомолярного уровня.

В настоящее время широко используются оптические биосенсоры на базе нанотехнологических устройств. Их работа основана на эффектах поверхностного плазмонового резонанса (см. главу 19) и резонансного зеркала (акустические биосенсоры), позволяющих в течение нескольких секунд регистрировать в реальном времени образование комплексов макромолекул с высокой концентрационной чувствительностью (до 10-12 м).

Перспективная область применения нанобиосенсоров - клиническая диагностика социально значимых протеомных болезней, например, гепатита В и С. В этом случае полученные данные совпадали с данными ИФА (около 10-9 м), но быстрота анализа составляла всего 5-8 мин и сохранялась возможность многократного (до 150 раз) использования одного и того же биочипа.

Интересными также стали подходы к анализу белок-белковых реакций без использования радиоактивной метки. Например, один из таких подходов основан на прямом превращении взаимодействия белков в информационный сигнал и его реализации на компакт-дисках к персональному компьютеру. В этом случае биочипом стал стандартный компакт-диск с нанесенными на нем биологическими полями. Подобный подход применен для комплексообразования стрептавидина и биотина, конканавалина А и альфа-маннозида.

Одним из перспективных подходов стало создание наносенсоров, способных работать в живом организме. Например, был создан отечественный микросенсор для определения содержания глюкозы и инсулина в крови. Это микроустройство представляет собой чип размерами 5-8 мм, вживляемый в тело пациента и регистрирующий уровень глюкозы в крови путем преобразования биохимической реакции в электрический сигнал. В последние годы на его основе разработан принципиально новый тип имплантируемого под кожу микросенсора для фотометрического контроля уровня глюкозы на основе углеродных нанотрубок, имеющих специфическое флуоресцентное покрытие. Такой наномикросенсор не только контролирует, но и оптимизирует уровни глюкозы и инсулина в крови.