

Румянцев С.А., Румянцев А.Г.

**ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ
БИОЛОГИЯ
И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ
ПОТЕНЦИАЛ ПУПОВИННОЙ
КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**



Москва
ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА
«ГЭОТАР-Медиа»
2013

УДК [612.2:604.7]:616-089.819.843

ББК 28.76+52.57+53.53

Р86

Авторы:

Румянцев С.А. — д-р мед. наук, профессор, руководитель отдела молекулярной и экспериментальной медицины ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, заведующий кафедрой онкологии и гематологии ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»;

Румянцев А.Г. — д-р мед. наук, профессор, академик РАМН, директор ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, профессор кафедры онкологии и гематологии ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова».

Рецензенты:

Черешнев В.А. — академик РАН и РАМН, профессор, председатель Комитета Государственной Думы по науке и наукоемким технологиям, директор Института иммунологии и физиологии УрО РАН, президент Российского научного общества иммунологов;

Чехонин В.П. — академик РАМН, академик-секретарь медико-биологического отделения РАМН, руководитель отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии ФГБУ «Государственный научный центр социальной и судебной психиатрии им. В.П. Сербского» Минздрава России, заведующий кафедрой медицинских нанобиотехнологий медико-биологического факультета ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова».

Румянцев С.А., Румянцев А.Г.

Р86 **Фундаментальная биология и терапевтический потенциал пуповинной крови: монография.** — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. — 640 с.

ISBN 978-5-9704-2438-4

Монография представляет собой первое отечественное системное исследование стволовых клеток крови пуповинного канатика человека в качестве биотехнологического материала для разработки клеточных клинико-диагностических и терапевтических технологий восстановления и замещения тканей и органов, систем доставки в клетки белков и генов.

Представлены собственные материалы использования гемопоэтических и мезенхимальных стволовых клеток пуповинной крови при трансплантации у гематологических, онкологических больных, больных с наследственными и генетическими заболеваниями; опыт организации в Москве Государственного банка пуповинной крови для трансплантаций гемопоэтических стволовых клеток. Приведены официальные документы, регламентирующие манипуляции с пуповинными стволовыми клетками в Российской Федерации.

Адресована врачам-гематологам, онкологам, иммунологам, педиатрам, биологам и всем исследователям в области клеточной биологии и трансплантологии.

УДК [612.2:604.7]:616-089.819.843

ББК 28.76+52.57+53.53

ISBN 978-5-9704-2438-4

© Румянцев С.А., Румянцев А.Г., 2012
© ООО Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа»,
оформление, 2013

Глава 1. Общая характеристика стволовых клеток человека

Оплодотворенную яйцеклетку (зиготу) можно считать «матерью» всех стволовых клеток. Эта клетка служит источником формирования всех клеток и тканей тела, включая плаценту и экстраэмбриональные мембраны, происходящие из данной клетки. Зигота обладает уникальной информацией, лежащей в основе построения всего организма и органогенеза. Таким образом, зигота является тотипотентной клеткой. В результате нескольких первых делений образуются клетки-бластомеры, сохраняющие тотипотентный потенциал. Однако на стадии бластоцисты многие из клеток вступают на специфические пути развития. Одна часть бластоцисты называется эпибластом, и эта область содержит клетки (клеточная масса, состоящая из внутренних клеток), из которых образуется собственно эмбрион. Клетки трофоэктодермы включают клетки на противоположном полюсе бластоцисты — эти клетки дифференцируются, образуя плаценту. Клетки, находящиеся во внутренней массе бластоцисты, являются полипотентными, т. е. каждая клетка способна продуцировать клетки, развивающиеся из трех эмбриональных зародышевых слоев (мезодерма, энтодерма и эктодерма). В развивающейся бластоцисте эмбриональные стволовые клетки отсутствуют, однако их можно выделить при культивировании клеток внутренней клеточной массы *ex vivo* из эпибласта, используя специальные методы и реагенты.

Выделение эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) у экспериментальных животных

Мышиные ЭСК были изолированы более 20 лет назад в процессе проведения исследований, посвященных разработке методов культивирования клеток эмбриональной тератокарциномы в культуре ткани [1]. Клетки внутренней клеточной массы получали из мышинных бластоцист и наносили на слой прикрепленных к субстрату эмбриональных фибробластов мышцы в присутствии культуральной среды, содержащей фетальную телячью сыворотку, а в некоторых случаях — среды, кондиционированной клетками мышинной тератокарциномы. На протяжении несколь-

ких недель появлялись колонии быстро растущих клеток. Эти колонии прочно прилипших, но пролиферирующих клеток можно было снять с культуральных чашек, с помощью дезагрегации ферментами получить суспензию, состоящую из отдельных клеток, и клетки вновь поместить на свежий слой эмбриональных фибробластов. Через несколько дней отдельные клетки формировали новые колонии, которые можно было снова изолировать и вновь культивировать тем же способом без видимой утраты клетками пролиферативного потенциала. Клетки, образующие колонии, были определены как эмбриональные стволовые клетки, причем при посеве их на слой эмбриональных мышинных фибробластов мышинные ЭСК пролиферируют неопределенно долго как плюрипотентные клетки [2].

Молекулярная регуляция самообновляющихся делений мышинных ЭСК остается неясной, но было установлено, что присутствие фактора роста, а именно фактора ингибиции лейкоза (LIF), необходимо для поддержания ЭСК в самообновляющемся состоянии *in vitro* даже в отсутствие мышинных фибробластов в качестве фидерных клеток. Кроме того, было показано, что добавление в культуры мышинных ЭСК (вместе с LIF) другого фактора роста — морфогенетического белка-4 костей (BMP-4) — дает возможность поддержания плюрипотентного состояния в отсутствие сыворотки [3].

К настоящему времени хорошо описаны строгие условия культивирования, необходимые для дифференцировки мышинных ЭСК *in vitro* в разнообразные соматические клетки специфических типов, такие как нейроны, гемопоэтические клетки, клетки поджелудочной железы, гепатоциты, мышечные клетки, кардиомиоциты и эндотелиальные клетки. В большинстве протоколов исследований по дифференцировке вначале из среды культивирования удаляют LIF, вслед за тем добавляют другие факторы роста, витамины, морфогены, молекулы внеклеточного матрикса или лекарственные вещества для активации специфической дифференцировки ЭСК. Для этой цели принято также добавлять уже дифференцированные клетки (не чистую популяцию, а преимущественно содержащую такие клетки). Получение высокоочищенной популяции дифференцированных клеток обычно требует применения определенных форм клеточной селекции: либо для повышения выживаемости селектированной популяции, либо для преимущественной элиминации нежелательной популяции [4]. Возможность выделения обогащенных популяций дифференцированных клеток навело многих исследователей на мысль о том, что они могут служить подходящим источником клеток для замещения старых, поврежденных или больных тканей у человека, если бы удалось получить плюрипотентные человеческие (h) ESC [16, 17].

Выделение эмбриональных стволовых клеток человека

Условия роста, позволяющие выделить и охарактеризовать ЭСК человека, были разработаны лишь в последнее десятилетие [5]. Первоначально первые стадии развития эмбриона человека воспроизводили путем оплодотворения *in vitro* с клиническими целями, и этот способ дал важный источник получения ЭСК. Эмбрионы выращивали до стадии бластоцисты, затем выделяли клетки внутренней клеточной массы; изолированные клетки наносили на облученный фидерный слой эмбриональных фибробластов мыши *in vitro*. После роста культуры в течение нескольких клеточных делений возникали колонии ЭСК человека, сходные с ЭСК мыши. Подобно мышиным клеткам ЭСК человека растут очень быстро без признаков возникающего старения и обладают высокой теломеразной активностью. В отличие от мышиных ЭСК для поддержания самообновляющегося состояния ЭСК человека одного LIF недостаточно в отсутствие мышиных фибробластов в качестве клеток-фидеров. Однако ЭСК человека можно выращивать на чашках, покрытых внеклеточным матриксом, в присутствии среды, кондиционированной мышиными эмбриональными фибробластами без добавления мышиных клеток-фидеров. Высокие дозы фактора роста фибробластов также помогают поддерживать ЭСК в недифференцированном состоянии даже в отсутствие клеток-фидеров ЭСК человека.

Плюрипотентная природа ЭСК человека была продемонстрирована путем введения этих клеток в заднюю конечность иммунодефицитным мышам. Гистологическое исследование возникающей в месте введения клеток опухоли, называемой тератомой, показало присутствие клеток многочисленных типов, включая желудочный и кишечный эпителий, клетки почечных канальцев и нейроны, — потомков зародышевых слоев энтодермы, мезодермы и эктодермы соответственно. В настоящее время образование тератомы у иммунодефицитных мышей продолжает служить единственным методом, позволяющим документировать плюрипотентность эмбриональных стволовых клеток человека [6].

Клонирование животных с помощью переноса ядра

Технология клонирования домашних животных и лабораторных грызунов основана на методах переноса ядра, когда ядро удаляют из овоцита и ядро соматической клетки донора электростатически вводят в лишенный ядра овоцит. Созданная таким способом зигота растет до стадии бластоцисты, затем эмбрион дезагрегируют и клетки из внутренней клеточной массы получают для создания ЭСК *in vitro* или бластоцисту имплантиру-