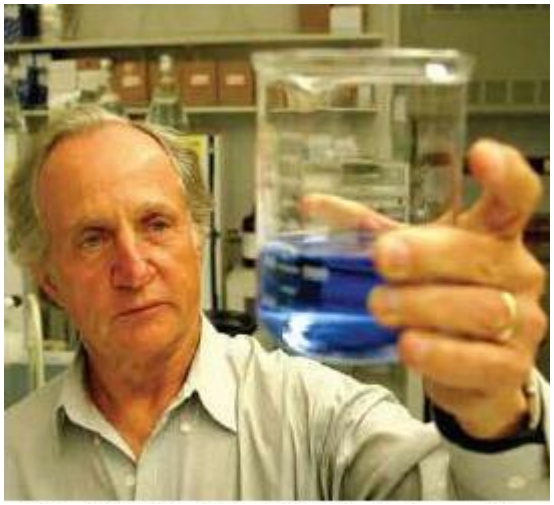
Клеточные технологии в лечении социально-значимых заболеваний

Д. В. Гольдштейн
профессор, доктор биологических наук

Крупнейшие открытия биологии в XX веке

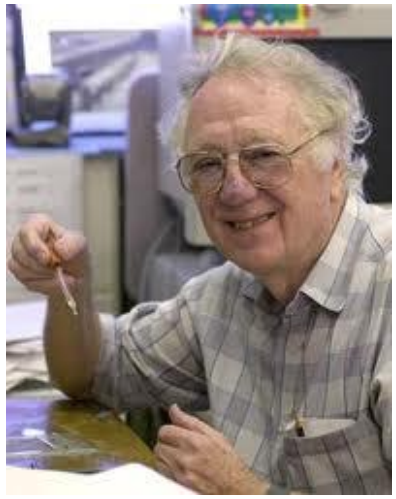
- Открытие двойной спирали ДНК (1953)
- Расшифровка генома человека (2001)
- Выделение эмбриональных стволовых клеток человека (1998)

Лауреаты Нобелевской премии по физиологии и медицине за 2007 год



Марио Капечи

Мартин Эванс



Оливер Смитис

Открытие принципов введения специфических генных модификаций у мышей с использованием эмбриональных стволовых клеток

Медицинская и социальная значимость проблемы

- Вложения в биотехнологические компании превышают 30 миллиардов долларов в год
- Клеточные технологии необходимы более чем 128 млн. пациентов

Данные по США

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК

ОБЩЕЕ СОБРАНИЕ
Российской академии медицинских наук
ПОСТАНОВЛЕНИЕ XIII (76) сессии

Москва 17–20 февраля 2004 г

- Клеточные технологии – приоритетное направление развития медицинской науки

  (Решение 76-й сессии РАМН от 17.02.2004)
- Клеточные технологии внесены в Перечень критических технологий РФ

  (Пр-842 Президента РФ от 21.05.2006)
- Правительственная комиссия по высоким технологиям и инновациям

  (Протокол №2 от 23.09.2008)

Зарегистрированные FDA клинические испытания

Критерии поиска	Результат
Cell Therapy	19511
Cell Therapy Heart Diseases	1121
Cell Therapy Neural Diseases	2984
Cell Therapy Bone Regeneration	45
Cell Therapy Diabetus Mellitus	586

Клеточно-генные технологии для лечения диабета

- Распространение диабета в мире постепенно достигает эпидемических масштабов
- Сегодня более 5 миллионов человек по всему миру больны диабетом первого типа, 395 тысяч из них – дети.
- Ежегодно число больных увеличивается на 5-7%, а каждые 12-15 лет - удваивается
- Высокая смертность и ранняя инвалидизация

Методы лечения диабета I типа

1. Инсулинотерапия
2. Трансплантация поджелудочной железы (островков Лангерганса)
3. Клеточные технологии и клеточно-генные технологии

Pdx-1 (IDX-1/ STF-1/ IPF-1) – ключевой фактор в развитии поджелудочной железы (ПЖ)

- Экспрессия Pdx-1 начинается в эпителии первичной кишечной трубки (около 30 дней эмбрионального развития) в ограниченной области
- Эмбрионы мыши, имеющие мутацию по гену Pdx-1, погибают в первые дни после рождения (отсутствует морфогенез ПЖ)
- Во взрослой ПЖ Pdx-1 экспрессируется только в β-клетках и очагах неогенеза эндокринной ткани
- Pdx-1 необходим для экспрессии нескольких генов β-клеток : инсулина, амилина, глюкокиназы, GLUT-2

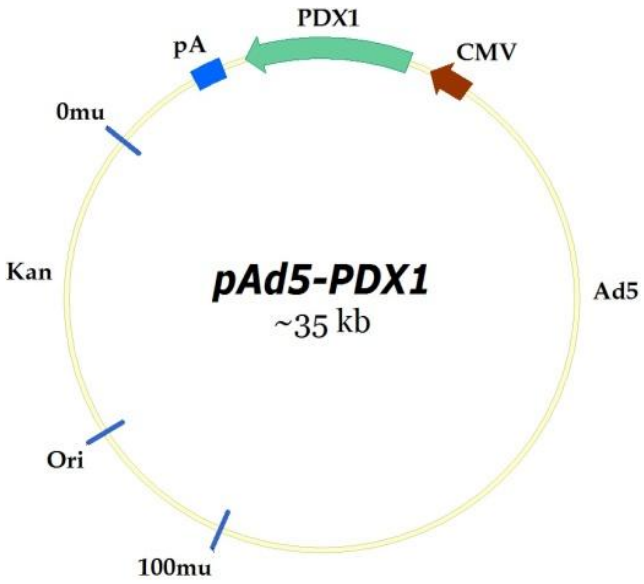
Основные этапы технологии

- Забор жировой ткани пациента
- Изоляция МСК ЖТ
- Селекция периваскулярной фракции МСК ЖТ
- Культивирование в селективной среде
- Трансфекция культуры клеток rAd5-PDX-1
- Созревание «островков», продуцирующих инсулин

Получение рекомбинантного аденовируса 5 серотипа, несущего ген *Pdx-1* (pAd5-Pdx1)

Преимущества аденовирусных векторов:

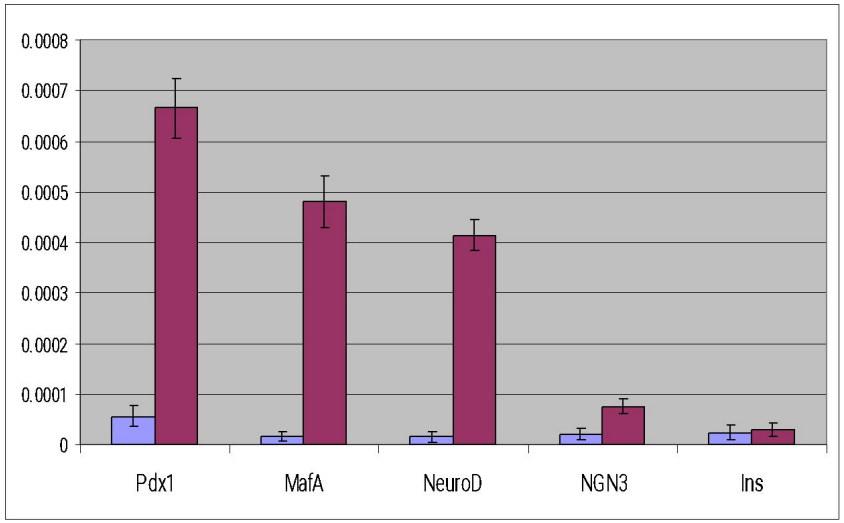
- способность инфицировать неделящиеся клетки
- большая емкость (до 28 т.п.н.), позволяющая клонировать практически любой ген человека
- высокий титр вирионов (до 10^11) при выделении из упаковочной линии
- автономную локализацию, исключающую опасность инсерций в геном
- разрешены к применению в генной терапии



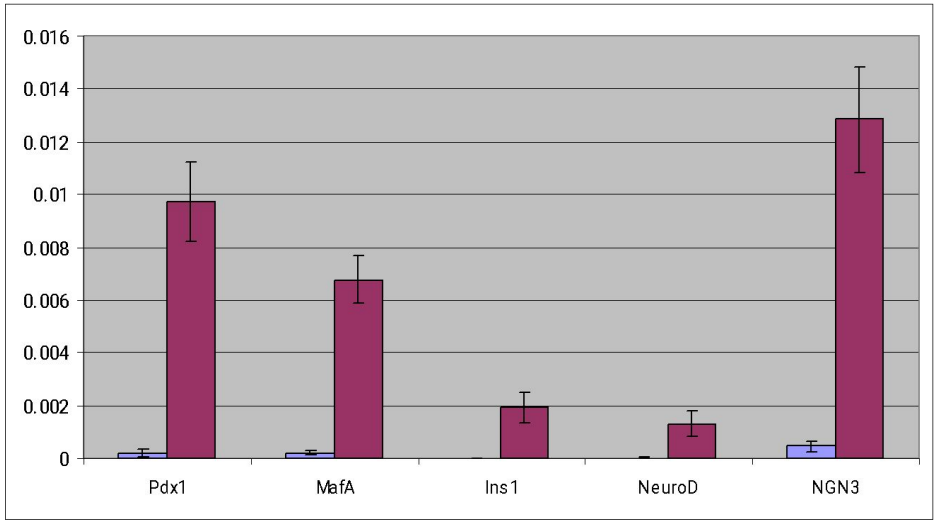
Плазмида pAd5- Pdx1

Сравнительная эффективность трансдифференцировки МСК ЖТ в общей и в изолированной популяции

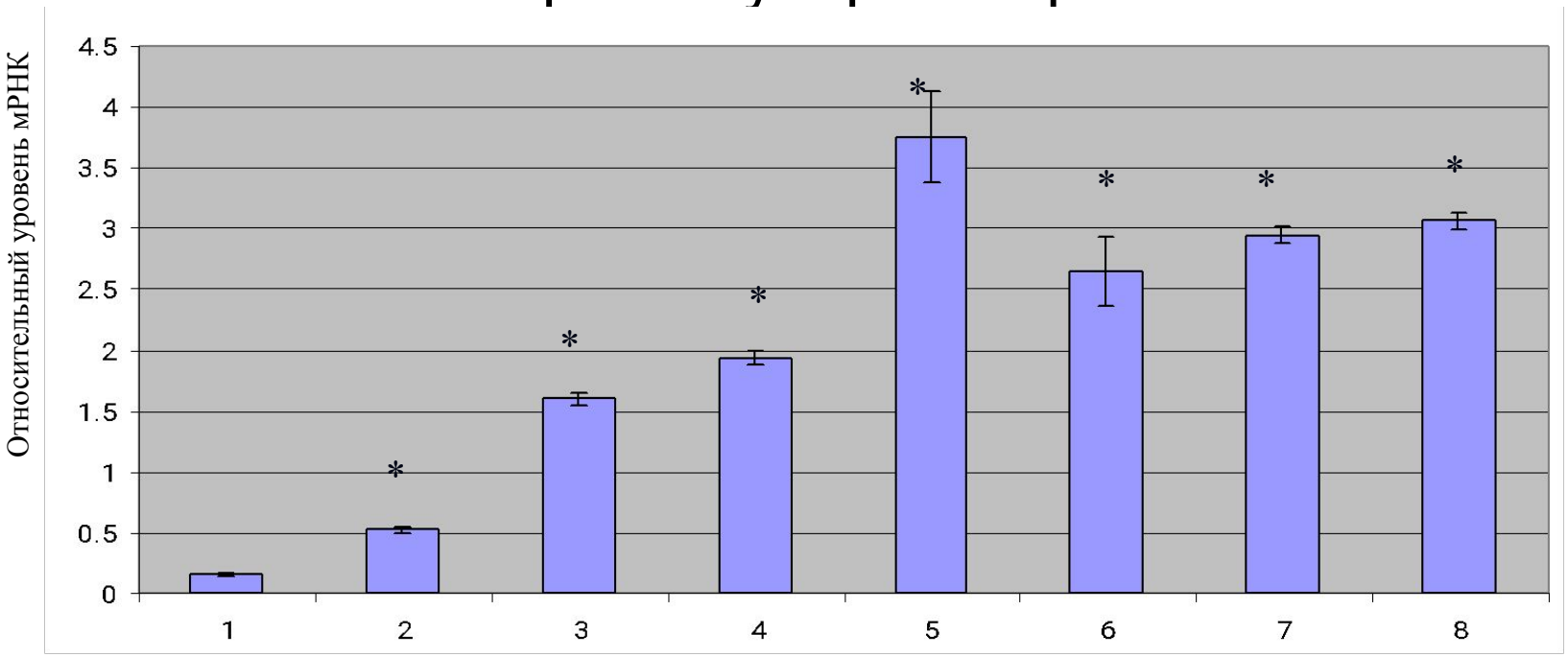
Общая популяция



Изолированная популяция

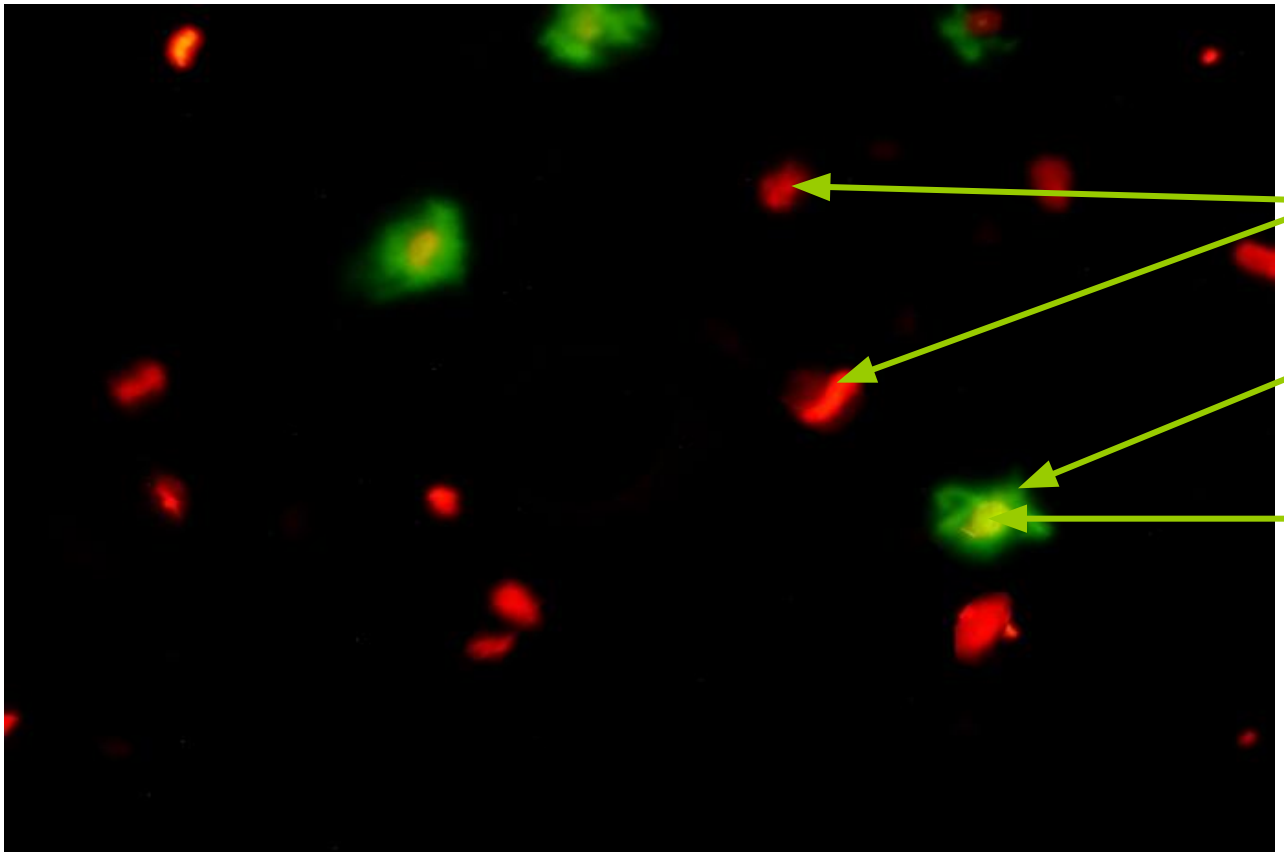


Влияние различных индукторов дифференцировки на уровень мРНК гена *Insulin* в трансфицированных клетках периваскулярного фенотипа

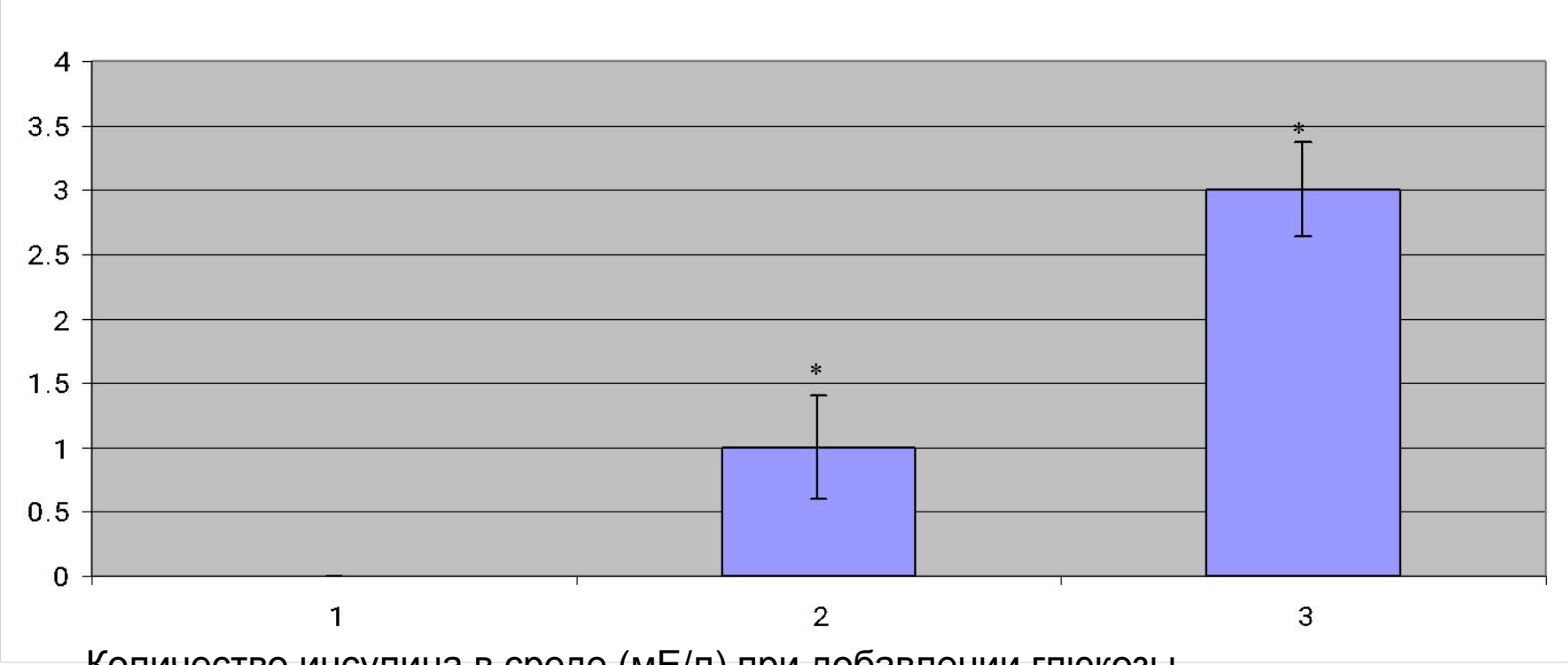


1 -контроль
2 - трансфицированные клетки в базовой среде
3 - в среде CMRL-1066
4 - в среде CMRL-1066 с GLP-1, 5- в среде CMRL-1066 с ретиноевой кислотой
6 - в среде CMRL-1066 с никотинамидом
7 - в среде CMRL-1066 с ретиноевой кислотой, GLP-1 и никотинамидом
8 - в среде CMRL-1066 с GLP-1 и ретиноевой кислотой.
* - $p<0,05$

Секреция инсулина трансфицированными МСК периваскулярного фенотипа из ЖТ и ПК



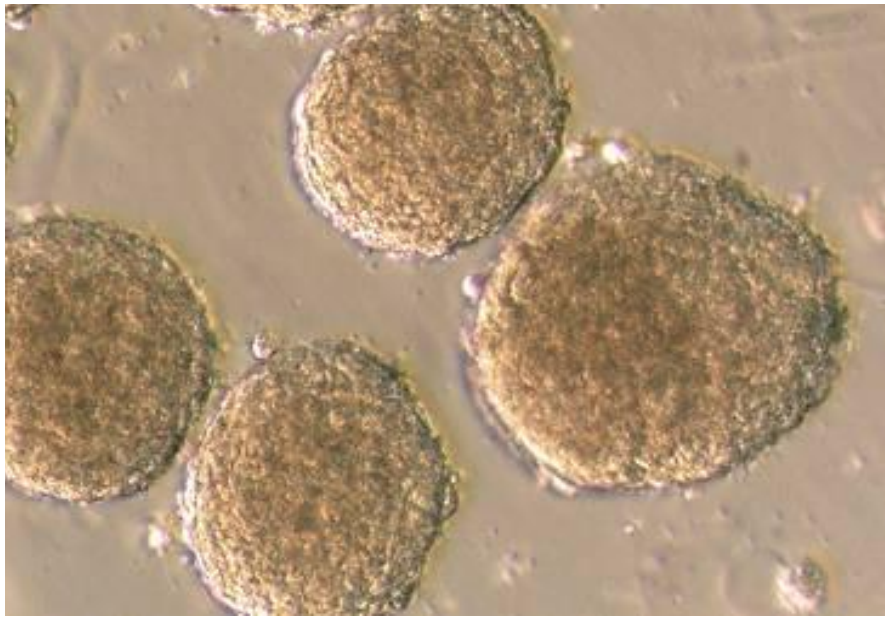
Секреция инсулина трансфицированными МСК периваскулярного фенотипа из ЖТ и ПК



Количество инсулина в среде (мЕ/л) при добавлении глюкозы
1 - среда с не трансфицированных клеток
2 - среда с трансфицированных клеток с содержанием глюкозы 5,56 mmol/л
3 - среда с трансфицированных клеток с содержанием глюкозы 25 mmol/л
* - $p<0,05$

Инсулин-продуцирующие островки in vitro

Впервые разработан метод получения функционально активных инсулин-продуцирующих клеток из популяций МСК жировой ткани и пупочного канатика человека периваскулярного фенотипа (CD146+CD31-) путем транзиентной трансфекции геном *Pdx1* с добавлением этапа культивирования в дифференцировочной среде



Спасибо за внимание!