



ОРГАНЫ ЧЕЛОВЕКА

ИЗ

Каждый год людям во всем мире пересаживаются десятки тысяч донорских органов. И чем быстрее расширяется практика трансплантации, тем острее ощущается их нехватка. Дать точную количественную оценку в глобальном масштабе трудно, но в среднем каждый день 16 человек в Европе и 22 человека в США умирают, так и не дождавшись пересадки сердца, печени или какого-либо иного органа. Разрыв между числом людей, нуждающихся в новом органе, и количеством доступных донорских органов продолжает увеличиваться.

Один из способов уменьшить дефицит донорских органов — их выращивание в лабораторных условиях. Несколько лет назад ученые полагали, что им удастся осуществить это с помощью стволовых клеток, способных давать начало тканям различного типа, и искусственного каркаса для формирования нового органа. Какие только усилия ни прилагали исследователи, чтобы заставить стволовые клетки превратиться в полноценно функционирующий человеческий орган! Попытки продолжаются и по сей день, но ощутимых результатов они не приносят.

БИОЛОГИЯ

Ученые делают первые шаги по выращиванию человеческих донорских органов в организме свиней, коров и других животных

Хуан Карлос
Исписуа Бельмонте

ТЕЛА

ЖИВОТНОГО

ОБ АВТОРЕ

Хуан Карлос Исписуа Бельмонте (Juan Carlos Izpisúa Belmonte) — профессор лаборатории экспрессии генов калифорнийского Института биологических исследований Солка.



Небольшое, но постоянно растущее число ученых, включая и автора настоящей статьи, возлагают надежды на иной подход — предоставить решение проблемы самой природе. Ведь эволюция уже изобрела эффективный способ превращения кучки идентичных клеток в высокоспециализированные ткани и органы, необходимые для создания целостного сложного организма, будь то мышь или человек. Этот удивительный процесс осуществляется в первые недели и месяцы после превращения оплодотворенной яйцеклетки в зародыш, который — в отсутствие какого-либо искусственного каркаса — растет, развивается и в конце концов превращается в полноценное животное с превосходно сформированными сердцем, легкими, почками и другими органами. Мы считаем, что вполне можем разработать технологию выращивания органов в теле свиньи и других животных для их последующей пересадки людям.

Понятно, что человеку, нуждающемуся в пересадке сердца, от обычного свиного сердца пользы будет мало. Прежде всего, его иммунная система с возмущением отвергнет имплант, полученный от существа иного вида. (Чтобы предотвратить такое отторжение, клапаны свиного сердца, предназначенные для пересадки людям, предварительно подвергаются сложной химической обработке.) Но мои коллеги и я убеждены, что выращивать человеческие органы, полностью состоящие из человеческих же клеток, в организме таких животных, как свиньи или коровы, все-таки можно. Такое животное будет химерой, то есть существом, подобным чудовищу из древнегреческой мифологии с головой льва, туловищем козы и крыльями орла. Наша мечта — создать химеру с помощью инъекции человеческих стволовых клеток

в тщательно подготовленный зародыш животного с тем, чтобы впоследствии, когда зародыш превратится во взрослое животное, в его теле присутствовали органы, состоящие исключительно из человеческих клеток. После принесения животного в жертву мы сможем взять его сердце, печень или почки, образованные человеческими клетками, и отдать их пациенту, нуждающемуся в трансплантате.

Какой бы фантастической ни казалась эта идея, ученые из США и Японии уже доказали ее жизнеспособность. Несколько групп исследователей вводили стволовые клетки крыс в специально подготовленные мышинные зародыши, а затем предоставляли вынашивать их суррогатным самкам мышей. Через несколько недель самки производили на свет животных, которые выглядели и вели себя как мыши, вот только их поджелудочная железа состояла из крысиных клеток. Сотрудники моей лаборатории и некоторые другие исследователи пошли еще дальше и инъецировали человеческие стволовые клетки в свиные эмбрионы. Несколько таких инъекций «прижились» и начали нормально развиваться в человеческие ткани. Затем мы трансплантировали химерные эмбрионы суррогатным свиноматкам, которые будут вынашивать их в течение трех-четырех недель. За это время мы проведем несколько промежуточных опытов, а потом определим, сколько клеток в химерных зародышах имеют человеческую природу. Если все пойдет как надо и нам удастся получить разрешение на продолжение эксперимента от государственных и местных властей, мы планируем дать свиноматкам возможность доносить детенышей до срока (у свиней беременность длится около четырех месяцев).

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ

- Используя последние достижения в области технологий стволовых клеток, биологи пытаются научиться выращивать человеческие органы в организме свиней и других животных. Это поможет значительно сократить дефицит донорских органов.
- Идея заключается во введении человеческих стволовых клеток в подготовленные особым образом свиные эмбрионы, которые будут развиваться во взрослых животных, содержащих человеческие поджелудочную железу, почки и другие органы.
- Если предварительные эксперименты окажутся успешными и ученые получат разрешение на их продолжение от местных и национальных контролирующих ведомств, целью исследователей станут получение полностью доношенных химерных животных и проверка пригодности выращенных ими человеческих органов для трансплантации людям.

Пока мы совершенно не готовы к реализации заключительного этапа «производства» химерных поросят. Мы еще плохо представляем себе, как нужно подготавливать человеческие стволовые клетки и эмбрионы животных, чтобы химерные организмы сохраняли жизнеспособность на протяжении всего внутриутробного развития. Много может пойти совсем не так, как хотелось бы. Но даже если нам и не удастся создать полностью сформированные органы, разработанные нами технологии помогут лучше понять начало, развитие и клинический исход многих сложных губительных болезней, включая рак. А в случае успеха данный подход может оказать огромное влияние на трансплантационную терапию. Когда мы начнем обеспечивать «запасными частями» человеческого тела, полученными от сельскохозяйственных животных, десятки тысяч нуждающихся в них людей, списки очередников на донорские органы навсегда уйдут в прошлое.

Уроки природы

За последние годы биологи узнали столько нового о росте и развитии эмбрионов, что мало-помалу мы начали пытаться изменять этот процесс в соответствии с собственными потребностями. Мы поняли, насколько сильно он зависит от точной локализации различных клеток в развивающемся организме в тот или иной момент времени. Клетки вырабатывают и высвобождают факторы роста — особые белки, которые в свою очередь (в зависимости от их концентрации в том или ином участке эмбриона) активируют или подавляют реализацию множества внутренних генетических программ. Опираясь на эти еще довольно сырые представления и работая в основном методом проб и ошибок, сотрудники нашей и других лабораторий мира пытаются заставить свиные эмбрионы создавать ткани, которые со временем смогли бы превращаться в человеческую почку, поджелудочную железу и другие органы.

В качестве «сырья» мы используем полученные от животных свиные яйцеклетки и сперматозоиды и выращиваемые в культуре человеческие стволовые клетки. Мы оплодотворяем свиную яйцеклетку свиным сперматозоидом, а через несколько часов оплодотворенная клетка (зигота) делится сначала на две, а затем на четыре, казалось бы, идентичные клетки. В каждой из них активируются одни и те же группы генов, что приводит к выработке различных белков, которые, помимо прочего, заставляют клетки продолжать деление.

Вскоре благодаря сложным взаимодействиям генов и белков эти некогда идентичные клетки по мере деления начинают вести себя по-разному. Через несколько дней после образования зиготы зародыш уже состоит из нескольких сотен клеток и представляет собой полый шарик (пузырек), в котором находится еще один шарик, образованный скоплением клеток. Такая структура получила название бластоцисты. Бластоциста — последний этап развития зародыша, когда в него еще можно вводить человеческие стволовые клетки: затем начнется формирование специализированных тканей (так называемых зародышевых листков), которые впоследствии дадут начало различным органам. Если немного опоздать, остатки стволовых клеток в свином эмбрионе попросту проигнорируют чужеродные стволовые клетки, что в конечном итоге приведет к их отмиранию.

Наша мечта — создать химеру с помощью инъекции человеческих стволовых клеток в тщательно подготовленный зародыш животного с тем, чтобы впоследствии, когда зародыш превратится во взрослое животное, в его теле присутствовали органы, состоящие исключительно из человеческих клеток

По мере роста эмбриона в нем формируются наружный, промежуточный и внутренний слои клеток. В это время точная локализация каждой отдельной клетки в крупном скоплении клеток обретает большее значение, чем когда-либо прежде. Как, например, показали предыдущие исследования, определенные клетки, находящиеся во внутреннем слое эмбриона, реагируют на белковые сигналы в их микроокружении включением гена *Pdx1*. Такое событие в свою очередь приводит к активации множества других генов, инициирующих развитие поджелудочной железы. Напротив, некоторые клетки, расположенные в среднем слое эмбриона, реагируют на внешние сигналы включением гена *Six2*, инициирующего формирование почек. Таким образом, хотя все клетки тела содержат одни и те же нуклеотидные последовательности в ДНК, особенности микроокружения, в котором пребывают клетки на той или иной стадии развития эмбриона, определяют, какие гены будут включаться или выключаться в них в это время, а значит и в какие ткани они в конце концов превратятся.

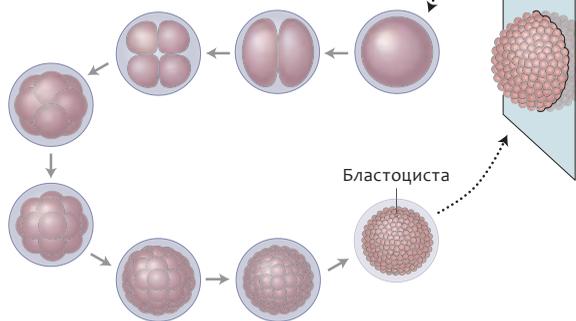
КАК ВЫРАСТИТЬ ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ ОРГАН В ТЕЛЕ СВИНЬИ

План исследований

Вполне возможно, что недавние достижения в области технологии стволовых клеток позволят ученым в недалеком будущем выращивать такие человеческие органы, как поджелудочная железа и почки, в теле свиней или других животных. Идея заключается в инъекции человеческих стволовых клеток определенного типа в подготовленные особым образом свиные эмбрионы. Затем эти так называемые химерные эмбрионы вынашиваются самками животных до тех пор, пока не сформируется предназначенный для трансплантации орган. Хотя сегодня ученые работают лишь над начальными этапами (1, 2, 3 и 4) этой процедуры, они отчетливо представляют себе, как она должна выглядеть в завершенном виде.

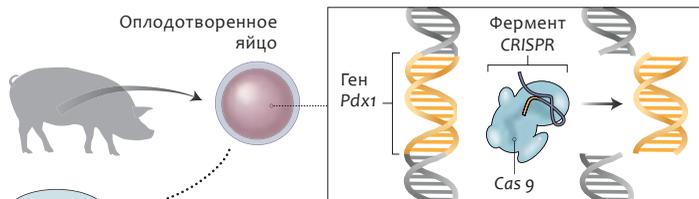
1 Превращение оплодотворенного яйца в бластоцисту

Оплодотворенная яйцеклетка, окруженная защитной оболочкой, начинает делиться с образованием двух, четырех и большего числа клеток.



2 Изменение генетической конституции оплодотворенного яйца

Ученые изменяют способность свиного эмбриона к формированию собственной поджелудочной железы, вырезая ген *Pdx1* с помощью «генетических ножниц» — фермента CRISPR/Cas9.



3 Инъекция человеческих стволовых клеток в бластоцисту

Ученые вводят в развивающийся зародыш так называемые индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) человека. Важно отметить, что человеческие ИПСК содержат гены *Pdx1*, а это значит, что химерный зародыш все-таки способен формировать поджелудочную железу, но этот орган будет состоять только из человеческих клеток.

4 Имплантация химерной бластоцисты в матку свиньи

Развитие химерного зародыша происходит в основном в теле суррогатной матери.

Тот факт, что один-единственный ген (например, *Pdx1* или *Six2*) способен инициировать всю последовательность событий, приводящую к формированию поджелудочной железы или почек, имеет огромное значение для нашего исследования. Благодаря удалению лишь одного критического гена, необходимого для роста поджелудочной железы (данный процесс я и мои коллеги называем опустошением эмбриональной ниши), наша лаборатория получила свиные зародыши, у которых не будет формироваться орган, вырабатывающий инсулин, если только мы не введем в них достаточное количество человеческих стволовых клеток, содержащих недостающий ген. А все остальное тело таких животных (в идеальном случае) будет состоять из свиных клеток.

Разработка методов опустошения эмбриональной ниши и ее последующего заполнения стволовыми клетками животного другого вида потребовала проведения массы предварительных экспериментов на грызунах. В 2010 г. Хиromitsu Накаучи (Hiromitsu Nakauchi) из Токийского университета и его сотрудники сообщили, что они успешно вырастили мышью с крысиной печенью. А недавно сотрудникам нашей лаборатории удалось генетически перепрограммировать мышинные эмбрионы таким образом, чтобы они могли использовать

крысиные стволовые клетки для формирования собственных глаз. Через три недели развития в теле самок мышей эти эмбрионы превращались в крошечных мышат с глазами из крысиных клеток.

Проблемы и вызовы

На каждом этапе нашего научного проекта нам приходится тщательно изучать различные проблемы, которые могут возникнуть при его реализации. Поскольку мыши слишком малы для формирования органов, подходящих по своим размерам нуждающимся в них людям, в настоящее время мы сосредоточили наше внимание на работе со свиными эмбрионами. От свиней можно получать органы практически любых размеров, которые могут потребоваться хирургам-трансплантологам для помощи людям самых разных габаритов. Кроме того, внутриутробное развитие зародышей у свиней гораздо длительнее, чем у мышей (всего примерно 20 дней). Для полного развития нормальным человеческим зародышам требуется около девяти месяцев, а потому ученым приходится придумывать различные биохимические трюки, чтобы ускорить ход внутренних часов человеческих стволовых клеток и тем самым синхронизировать их созревание (дифференцировку)

5 Дальнейшее развитие химерного эмбриона

Сегодня ученым официально разрешено выращивать химерные эмбрионы не более шести недель. Беременность у свиней длится примерно четыре месяца.

Отделы кишечника:

- Передний
- Средний
- Задний

Окружающие клетки посылают сигналы ИПС-клеткам

ИПС-клетки начинают превращаться в клетки поджелудочной железы

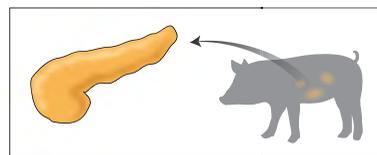
Во время развития некоторые человеческие клетки могут проникать в другие участки эмбриона, что чревато нежелательными последствиями.

Желудок
Печень
Желчный пузырь
Вентральный панкреатический зачаток
Дорсальный панкреатический зачаток

Печень
Желчный пузырь
Желудок
Человеческая поджелудочная железа

6 Зрелая человеческая поджелудочная железа

Если процедура прошла удачно, после рождения химерного поросенка ученые могут получить зрелый орган, пригодный для трансплантации людям.



с темпами развития эмбриона-реципиента. От ученых потребует гораздо меньше усилий приравнивание созревания этих клеток к более растянутым срокам развития свиных эмбрионов, чем к быстротечному развитию мышинных зародышей.

В настоящее время сотрудники нашей лаборатории сосредоточились на выращивании поджелудочной железы и почек, потому что формирование каждого из этих органов в эмбрионах определяется всего одним геном. Инициация процессов, связанных с формированием таких органов, как сердце, возможно, зависит от нескольких генов, а это значит, что опустошение эмбриологической ниши для них потребует гораздо более сложного удаления нескольких генов. Недавно группа исследователей под руководством Джорджа Черча (George Church) из Гарвардского университета приспособила эффективный инструмент редактирования генома, фермент *CRISPR/Cas9*, для удаления нескольких генов из различных сайтов ДНК эмбриона. Тем самым ученые подготовились к проведению более сложных генетических манипуляций, которые, возможно, потребуются для выращивания других органов в теле животных.

Еще более серьезная проблема состоит в том, что используемые в исследованиях человеческие стволовые клетки должны быть совсем незрелыми

и обладать способностью превращаться в самые разные типы тканей. Биологи называют такие клетки тотипотентными. Этому условию вполне могли бы соответствовать человеческие эмбриональные стволовые клетки из зигот, получаемых в клиниках искусственного оплодотворения, но их использование сопряжено с серьезными этическими проблемами.

За последние десятилетия ученые разработали ряд технологий, которые, на первый взгляд, вполне могли бы решить возникшую дилемму. Они научились заставлять зрелые клетки, взятые из кожи или кишечника взрослого человека, превращаться в своего рода стволовые клетки, получившие название индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). В этическом отношении эксперименты с человеческими ИПСК, безусловно, более приемлемы, чем с человеческими эмбриональными стволовыми клетками. Кроме того, использование ИПСК дает ученым возможность создавать органы, генетически и иммунологически полностью соответствующие конкретным пациентам.

Более обстоятельное изучение полученных на сегодня ИПСК показывает, однако, что они «недостаточно незрелы» для того, чтобы выжить внутри химерного эмбриона. Они настолько сильно

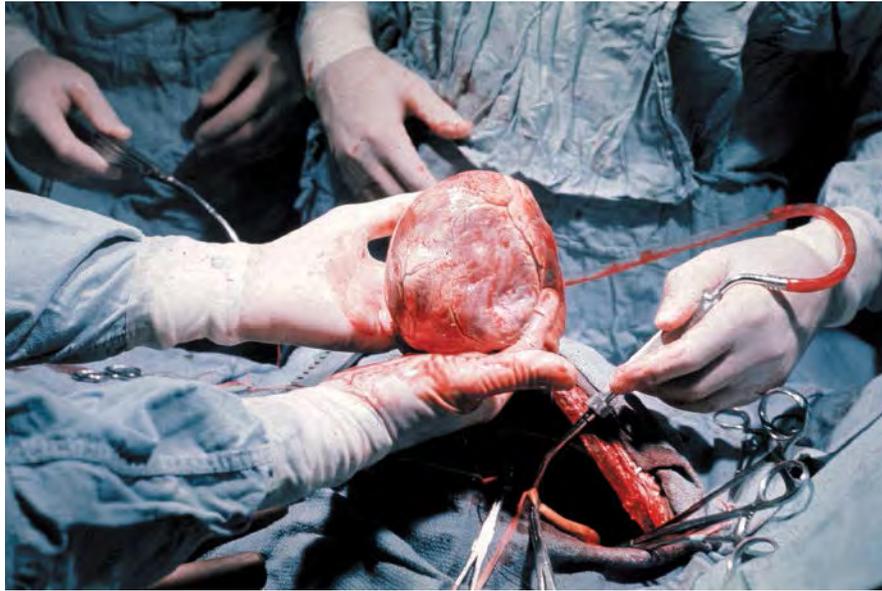
приблизились к такому состоянию, чтобы превратиться в один из нескольких специфических типов клеток, что уже не в состоянии реагировать на какие-либо биохимические сигналы от эмбриона, пытающиеся заставить их стать чем-то иным. А коль скоро ИПСК не реагируют на сигналы должным образом, развивающийся эмбрион отторгает их как нечто чужеродное.

Недавно сотрудник нашей лаборатории Жунь У (Jun Wu), подвергнув ИПСК воздействию уникальной комбинации факторов роста, обнаружил, что некоторые из этих клеток начали адекватным образом реагировать на широкий спектр эмбриональных сигналов. Как показывают предварительные испытания, обработанные таким образом человеческие ИПСК могут встраиваться в бластоцисты. Мои коллеги и я оставили рост экспериментальных эмбрионов на разных этапах развития и изучали их под микроскопом, чтобы выяснить, насколько хорошо «уживаются» друг с другом донорские клетки и клетки эмбриона-реципиента. Далее мы планируем продлить срок развития эмбрионов до шести недель, когда уже станут различимы зародышевые листки. В это время зародыши начнут формировать зачатки различных тканей и органов.

Проблемы, однако, останутся и в том случае, если мы научимся получать ИПСК, способные полностью встраиваться в свиные эмбрионы. В эволюционном плане люди и свиньи стоят друг от друга гораздо дальше, чем мыши и крысы, которые уже были использованы для создания химерных существ. А значит, человеческие ИПСК могли попросту утратить способность к восприятию всех биохимических сигналов от эмбрионов столь далекого родственника, как свинья. И если мы не сможем обойти эту проблему с помощью биохимических манипуляций, нам, возможно, придется проверять правильность наших представлений на других видах животных — например, коровах.

Дальнейшие шаги

В 2012 г. я обсудил эти и другие проблемы с Жозепом Марией Кампистоном (Josep Maria Campistol) — генеральным директором Барселонской клинической больницы, получившей международную известность благодаря высочайшему уровню трансплантационной службы. Я прекрасно помню его совет: «Единственный способ узнать, способны ли человеческие ИПСК преодолеть межвидовой барьер и участвовать в формировании человеческого органа в теле свиньи, — это засучить рукава и приступить к эксперименту».



Доноры: с тех пор как в 1968 г. человеку было впервые трансплантировано донорское сердце, выживаемость пациентов увеличилась, но дефицит донорских органов сильно возрос

Слова Кампистоля побудили меня к действию. Но я понимал, что самостоятельно выполнить такую задачу наша лаборатория не сможет. Для проверки своих идей мои сотрудники и я создали международный консорциум из эмбриологов, ветеринаров и специалистов по стволовым клеткам и биоэтике и в 2015 г. начали вводить человеческие ИПСК в свиные эмбрионы.

Большинство наших опытов были проведены в Калифорнии и Испании под контролем местных и национальных регулирующих ведомств. До сих пор мы давали возможность человеко-свиным химерным эмбрионам развиваться в теле самок в течение примерно четырех недель, после чего животные забивались. (Условия договора, выработанные нами совместно с контролирующими ведомствами, требовали умерщвления и свиноматок, и эмбрионов.)

В целом результаты проведенных нами экспериментов помогли узнать много нового о развитии химерных эмбрионов. Мы начинаем понимать, какое количество человеческих ИПСК и в какие сроки нужно имплантировать в эмбрион, чтобы обеспечить их наиболее успешное развитие. Кроме того, мы приступили к изучению процессов, инициирующих миграцию человеческих клеток в различные участки зародыша.

Этический баланс

Как бы ученые ни совершенствовали используемые экспериментальные процедуры, они обязаны взаимодействовать с широкой общественностью для совместного решения этических, социальных и юридических проблем, порождаемых новой

областью исследований. Созданный нами консорциум в течение полутора лет тесно сотрудничал со специалистами по этике и представителями контролирующих ведомств Калифорнии и Испании для выработки принципов и положений, регулирующих нашу научную работу.

Безусловно, мы строго придерживаемся стандартных правил, связанных с защитой и благополучием животных, которые должны соблюдаться всеми исследователями, работающими с живыми существами. Среди этих принципов — безболезненное проведение экспериментов, обеспечение животных надлежащим жизненным пространством, уровнем физической активности и т.д. Специфика наших исследований, однако, порождает ряд дополнительных проблем. Как уже отмечалось, подлинно тотипотентные стволовые клетки могут давать начало любым тканям. Но три типа тканей требуют от нас особенно пристального внимания — это нервная ткань, сперматозоиды и яйцеклетки, потому что их «очеловечивание» в организме животных чревато появлением существ, создавать которые никто не хочет.

Какой, например, произойдет этический кошмар, если мозг свиньи заполнят человеческие нейроны и он станет способным к абстрактному мышлению! Мы можем предотвратить такой поворот событий, если перед введением человеческих ИПСК в эмбрион удалим из них генетическую программу, определяющую их превращение в нервные элементы. В этом случае, даже если человеческим стволовым клеткам удастся занять нишу эмбриона, ответственную за формирование мозга, развиваться дальше они не смогут и мозг животного на все 100% будет состоять из свиных нейронов.

Другой сценарий, которого так хочется избежать ученым, — возможность скрещивания химерных животных друг с другом. Хотя такая вероятность невелика, всегда есть шанс, что некоторые из имплантированных в эмбрион человеческих стволовых клеток вместо того, чтобы остаться в отведенной им учеными нише и приступить к формированию желаемого органа, смогут мигрировать в нишу, дающую начало репродуктивной системе. В результате на свет появятся животные, вырабатывающие сперматозоиды или яйцеклетки, практически идентичные человеческим. Если такие животные начнут затем размножаться, последствия могут привести к этической катастрофе: в теле свиноматки начнет развиваться полноценный человеческий плод, возникший в результате оплодотворения «человеческим» сперматозоидом хряка «человеческой» яйцеклетки самки свиньи.

Лучший способ избежать осложнений, связанных с подобными тревожными неожиданностями, — использовать для трансплантации органы только химерных животных, созданных, так сказать, с нуля, то есть путем оплодотворения яйцеклеток, взятых от самок свиней, сперматозоидами, полученными от хряков, с последующим добавлением к образовавшимся эмбрионам человеческих стволовых клеток.

Ученые, разумеется, тоже люди. Порой мы слишком увлекаемся, выдвигая новые идеи и разрабатывая новые технологии. И иногда испытываем чрезмерный оптимизм по поводу значения своих открытий — не только для тех областей науки, в которых мы работаем, но и для всего человечества в целом. Тем не менее результаты предва-

Всегда есть шанс, что некоторые из имплантированных в эмбрион человеческих стволовых клеток вместо того, чтобы остаться в отведенной им учеными нише и приступить к формированию желаемого органа, смогут мигрировать в нишу, дающую начало репродуктивной системе

рительных исследований, описанные мною в этой статье, позволяют мне выразить осторожную надежду, что в ближайшие десятилетия мы обязательно научимся получать человеческие органы из химерных эмбрионов животных. ■

Перевод: В.В. Свечников

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ИСТОЧНИКИ

- Хохедлингер К. Персональные целители // ВМН, № 7, 2010.
- Ethical Standards for Human-to-Animal Chimera Experiments in Stem Cell Research. Insoo Hyun et al. in Cell Stem Cell, Vol. 1, No. 2, pages 159–163; August 16, 2007. [www.cell.com/cell-stem-cell/full-text/S1934-5909\(07\)00080-X](http://www.cell.com/cell-stem-cell/full-text/S1934-5909(07)00080-X)
- Generation of Rat Pancreas in Mouse by Interspecific Blastocyst Injection of Pluripotent Stem Cells. Toshihiro Kobayashi et al. in Cell, Vol. 142, No. 5, pages 787–799; September 3, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.039>
- Dynamic Pluripotent Stem Cell States and Their Applications. Jun Wu and Juan Carlos Izpisua Belmonte in Cell Stem Cell, Vol. 17, No. 5, pages 509–525; November 5, 2015.