
ОБЗОРЫ И ЛЕКЦИИ

УДК 602.9:616-003.93

**СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ:
ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ***А. Н. Лызиков, Б. Б. Осипов, А. Г. Скуратов, А. А. Призенцов***Гомельский государственный медицинский университет**

Цель: проанализировать достижения и перспективы использования стволовых клеток в регенеративной медицине.

Материалы и методы. Проведен аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы, интернет-ресурсов (PubMed и др.) по вопросу использования стволовых клеток в регенеративной медицине.

Результаты. К настоящему времени накоплен богатый опыт как экспериментального, так и клинического использования стволовых клеток с терапевтической целью при заболеваниях сердечно-сосудистой, нервной систем, эндокринных, гематологических, аутоиммунных заболеваниях, болезнях опорно-двигательного аппарата и др.

Заключение. Несмотря на успехи и достижения в регенеративной медицине последних лет, все еще остается ряд проблем и нерешенных вопросов. Использование как эмбриональных, так и постнатальных стволовых клеток имеет свои недостатки. Остается до конца не изученным точный механизм действия введенных стволовых клеток. Необходимым также является изучение отдаленных последствий трансплантации стволовых клеток (в частности, риск онкогенеза).

Ключевые слова: стволовые клетки, регенеративная медицина, трансплантация, дифференцировка, иммуномодуляция.

**STEM CELLS IN REGENERATIVE MEDICINE:
ACHIEVEMENTS AND PROSPECTS***A. N. Lyzikov, B. B. Osipov, A. G. Skuratov, A. A. Prizentsov***Gomel State Medical University**

Purpose: to analyze achievements and prospects of the application of stem cells in regenerative medicine.

Material and methods. We performed analytical review of national and foreign literature, Internet resources in PubMed and others dealing with the application of stem cells in regenerative medicine.

Results. Rich experience of experimental and clinical application of stem cells in the treatment of cardiovascular, neurological, endocrine, hematological, autoimmune, traumatological, and other diseases has been gained by now.

Conclusion. Notwithstanding the success and achievements in regenerative medicine during the recent years, a lot of problems and questions remain unsolved. The application of both embryonic stem cells and postnatal stem cells has its pros and cons. The exact mechanism of the effect of transplanted stem cells remains unclear. It is necessary to study long-term effects of stem cell therapy (in particular, the risk of oncogenesis).

Key words: stem cells, regenerative medicine, transplantation, differentiation, immunomodulation.

Введение

Исследования и достижения последних десятилетий в вопросах изучения стволовых клеток (СК) привели к созданию новой отрасли медицины — регенеративной медицине. Данное направление возникло на стыке множества наук и технологий, включая тканевую инженерию, клеточную биологию, молекулярную биологию, гистологию, биологию развития, биохимию, физику, химию, прикладную инженерию и прочие дисциплины, что позволяет называть данную отрасль медицины междисциплинарным видом научно-практической деятельности. С 2006 г. в Великобритании выходит специализированный журнал «Regenerative medicine». Появились многочисленные инсти-

туты и компании, занимающиеся разработкой методов лечения с помощью стволовых клеток.

Целью регенеративной медицины является восстановление пораженной заболеванием или поврежденной (травмированной) ткани с помощью активации эндогенных стволовых клеток, а также трансплантации клеток. Регенеративная медицина также подразумевает выращивание тканей и органов в условиях *in vitro* с последующей пересадкой, неспособное к самостоятельной регенерации. Важнейшим разделом регенеративной медицины является клеточная терапия — использование живых клеток различного происхождения, которые при введении в организм пациента способны к активному функционированию, результатом чего

является улучшение или модификация существующей функции органа или ткани либо восстановление или замена утраченной функции [1].

В регенеративной клеточной терапии используются эмбриональные и зрелые (постнатальные) стволовые клетки, поскольку те и другие обладают необходимым пролиферативным и, следовательно, регенеративным потенциалом. Проллиферативный потенциал эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) существенно выше, чем у СК взрослого организма. Однако чрезмерные плюрипотентность и пролиферативная способность ЭСК требуют тщательного контроля поведения импланта после пересадки из-за повышенной иммуногенности и потенциальной канцерогенности этих клеток. Также существенным недостатком использования ЭСК для заместительной терапии является этическая сторона вопроса. Учитывая все это, более предпочтительным становится использование зрелых СК. Основным преимуществом постнатальных СК является возможность использования аутогенного клеточного материала, а значит, не возникает проблем иммунологической совместимости, а также этических препятствий к их использованию. Нет сомнений, что ЭСК невозможно использовать в качестве аутогенного материала, так как выделение их из эмбриона несовместимо с его дальнейшим развитием.

Стволовые клетки взрослого организма можно разделить на три основных группы: гемопоэтические (кроветворные), мультипотентные мезенхимальные (стромальные) и тканеспецифичные прогениторные.

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) и клетки-предшественники являются наиболее полно охарактеризованными СК взрослого организма. Они находятся в костном мозге и отвечают за непрерывное обновление клеток крови и иммунной системы. Ранние ГСК человека характеризуются фенотипом CD34⁺ CD90⁺ или CD34⁺ CD38⁻. Исключительно полезным свойством ГСК является их способность восстанавливать все клеточные линии крови. ГСК являются первым типом стволовых клеток, использованных в клеточной терапии [2], и ныне широко применяются при трансплантации костного мозга для лечения лейкозий, апластических анемий, первичных и комбинированных иммунодефицитов [3].

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК), первоначально обнаруженные в строме костного мозга, были затем найдены и в других органах, включая плаценту, пуповину, печень и жировую ткань. Недавние исследования показали, что МСК распространены повсеместно, поскольку в качестве периваскулярных клеток (перипитов) являются интегральным клеточным компонентом эндотелия. МСК не несут

типичных поверхностных маркеров гемопоэтических линий клеток (антигены CD14, CD34 и CD45) и позитивны по CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 и Stro-1.

Особенностью МСК, объясняющей их широкое применение в клеточной терапии, является очень низкая иммуногенность, что обеспечивает возможность пересадки клеток от практически любого неродственного донора практически любому реципиенту без использования иммуносупрессивной терапии. Кроме того, МСК обладают иммуносупрессивными свойствами против Т-клеток, что делает эти клетки эффективными терапевтическими агентами при лечении больных с остро выраженной реакцией отторжения трансплантированной ткани по причине тканевой несовместимости.

Цель работы

Проанализировать достижения и перспективы использования стволовых клеток в регенеративной медицине.

Материалы и методы

Проведен аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы, интернет-ресурсов (PubMed и др.) по вопросу использования стволовых клеток в регенеративной медицине.

Результаты и обсуждение

К настоящему времени накоплен богатый опыт как экспериментального, так и клинического использования стволовых клеток с терапевтической целью при заболеваниях сердечно-сосудистой, нервной систем, эндокринных, аутоиммунных заболеваниях, болезнях опорно-двигательного аппарата, органов пищеварения и др.

Применение СК в гематологии

Одной из первых сфер клинического применения СК стала гематология, а именно, гемобластозы: острые лейкозы, хронический миелолейкоз, миеломная болезнь и др.

При перечисленных заболеваниях опухолевые гемопоэтические клетки разрушаются с помощью больших доз химиотерапии и (или) общего облучения с последующим восстановлением нормального гемопоэза путем трансплантации СК костного мозга [4]. Существует три вида трансплантации: аутогенная, сингенная и аллогенная. При аутогенной трансплантации пациенту пересаживают его собственные стволовые клетки, при сингенной — взятые у однояйцевого близнеца, при аллогенной — взятые у его родственников. Кроме того, возможно использование стволовых клеток человека, не являющегося родственником пациента (неродственный донор).

Применение СК в неврологии

Клеточная терапия в последнее время становится новой стратегией в борьбе с такими неврологическими расстройствами, как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, острое нарушение мозгового кровообращения, боковой

амиотрофический склероз, болезнь Хантингтона и др. На сегодняшний день существует достаточно богатый опыт экспериментального применения СК костного мозга в лечении неврологических заболеваний у модельных животных.

Kim и соавт. показали положительный терапевтический эффект от внутривенного введения СК жирового происхождения трансгенным мышам с болезнью Альцгеймера. Позитивный эффект проявлялся в улучшении когнитивных способностей (обучение и память), ускорении эндогенного нейрогенеза и увеличении синаптической стабильности в головном мозге трансгенных мышей [5]. Marconi и соавт. вводили СК жирового происхождения трансгенным мышам с моделированным боковым амиотрофическим склерозом. В результате наблюдалось замедление развития двигательных расстройств на несколько недель, а также увеличение числа поясничных мотонейронов и факторов роста нейронов [6].

Исследование влияния СК на течение болезни Паркинсона проводилось на грызунах, а также более крупных животных (обезьянах). В одном из исследований крысам с ротенониндуцированной болезнью Паркинсона вводили СК, что приводило к увеличению в сыворотке крови трансформирующего фактора роста β , белка-хемоаттрактанта моноцитов, уровня дофамина в головном мозге. Все это подтвердило предположение об иммуномодулирующем, противовоспалительном и нейротрофическом эффекте от введения СК. Введение СК в комбинации со специальным ферментом (Ad-NTN-TN) макакам-резус с моделированной болезнью Паркинсона приводило к улучшению паркинсонического поведения: уменьшению тремора и увеличению подвижности [7].

Также имеются свидетельства положительного эффекта от введения СК лабораторным животным с другими неврологическими и нейрохирургическими заболеваниями (спинальная травма, рассеянный склероз, острое нарушение мозгового кровообращения) [8].

Применение СК в кардиологии

Многочисленные исследования на грызунах и свиньях показали, что МСК могут заселять ткань сердца и дифференцироваться в ней. В 2001 г. Тома и соавт. показали, что человеческие МСК костномозгового происхождения, введенные в ткань сердца иммунодефицитных крыс, остаются там через 4 дня после введения и через некоторое время приобретают морфологию, не отличимую от исходных кардиомиоцитов. Однако количество обнаруженных в сердце МСК составило только 0,44 % от введенной дозы [9]. Quevedo и соавт. в модели хронической ишемической кардиомиопатии у свиней показали возможность аллоген-

ных МСК заселять и дифференцироваться в кардиомиоциты, гладкомышечные клетки и эндотелиоциты [10].

В последние годы был проведен ряд исследований на свиньях, овцах и собаках, которые оценивали эффект введения МСК на смоделированную в эксперименте острую (после инфаркта миокарда) и хроническую левожелудочковую недостаточность. В качестве способа доставки стволовых клеток использовались внутривенное введение, открытое хирургическое введение, интракоронарное введение, ретроградное венозное коронарное введение, трансэндокардиальная инфузия [11]. В ходе данных исследований были получены результаты, свидетельствующие, что терапия МСК улучшает функцию левого желудочка, уменьшает размеры постинфарктного рубца, увеличивает перфузию миокарда, при этом интрамиокардиальное введение МСК показало наилучшие результаты.

Успехи экспериментальных исследований привели к началу клинических испытаний МСК в лечении пациентов как с острым инфарктом миокарда, так и хронической ишемической кардиомиопатией.

Одним из первых Strauer в 2001 г. интракоронарно ввел стволовые клетки 46-летнему пациенту с острым инфарктом миокарда. В дальнейшем он продолжил вводить СК костного мозга пациентам с острым инфарктом миокарда и ИБС. Результатом стало улучшение функции сердца (фракция выброса увеличилась на 3–36 %, в среднем на 11,4 %) и уменьшение зоны инфаркта на 1–60 % (в среднем 34 %). Положительный эффект сохранялся в течение 3 лет и более [12].

Chen и соавт. исследовали эффект интракоронарного введения аутологических МСК костного мозга у пациентов с подострым инфарктом миокарда. Через 3 месяца после введения МСК у них отмечалось улучшение функции левого желудочка по сравнению с пациентами контрольной группы. Результаты были подтверждены инструментальными методами (вентрикулография, ПЭТ) [13]. Также было показано, что введение МСК было безопасным способом терапии.

Основываясь на экспериментальных данных, что введение МСК может стимулировать обратное ремоделирование в модели ишемической кардиомиопатии у свиней, Williams и соавт. провели клиническое исследование у пациентов с хронической ишемической кардиомиопатией. Оно показало, что интрамиокардиальное введение МСК приводило к обратному ремоделированию миокарда, улучшению локальной сократимости зоны постинфарктного рубца. Улучшение наблюдалось через 3 месяца после введения и сохранялось через 12 месяцев [14].

Применение СК в лечении аутоиммунных заболеваний

В ходе многочисленных экспериментальных и клинических исследований было показано, что пересаженные реципиенту СК далеко не всегда действуют «напрямую», попадая в пораженный орган и дифференцируясь в тканеспецифичном направлении. Зачастую терапевтический эффект связан с иммуномодулирующим/иммунодепрессивным и противовоспалительным действием на пораженный орган. Этот эффект и лежит в основе использования СК для лечения аутоиммунных заболеваний (системная красная волчанка, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, сахарный диабет 1 типа и др.), а также синдрома «трансплантат против хозяина».

Применение СК в эндокринологии

Основным объектом исследований стволовых клеток в эндокринологии является сахарный диабет 1 типа. Последние достижения биологии СК дают возможность применения трансплантационной терапии больным СД 1 типа с помощью метода генерирования функциональных панкреатических β -клеток. Некоторые ткани являются источником клеток-предшественников или СК, которые в случае успешного выделения и размножения в условиях *in vitro*, а затем дифференцировки для приобретения фенотипа β -клеток могут быть потенциальным источником ткани для трансплантации. Популяции СК можно получить также размножением тканевых СК из биоптатов поджелудочной железы, печени или костного мозга больного. Независимо от происхождения СК будут дифференцироваться в инсулин-продуцирующие клетки (ИПК), которые будут формировать инсулиноподобные структуры для пересадки пациентам с СД [15]. Одним из основных источников зрелых СК, способных к дифференцировке с образованием β -клеток, является ПЖ. Экспериментальными исследованиями было показано, что эпителий протоков ПЖ служит источником клеток, способных к неогенезу островков у взрослых животных при их повреждении, а также может являться источником нормального обновления островков в течение всей жизни [16]. В исследованиях на культуре тканей показана способность клеток протоков человека и мышей к дифференцировке с образованием ИПК. Предполагают, что СК костного мозга могут служить обновляемым источником инсулин-положительных клеток, имеющих в ряде тканей у мышей со стрептозотоциновым СД [17]. Возможно, что у больных СД 1 типа непрерывное обновление островков происходит за счет клеток собственного костного мозга. Однако вновь образованные β -клетки быстро разрушаются антителами. В то же время клетки костного мозга являются пер-

спективным источником аутологичных клеток, так как их биопсия не вызывает сложностей.

Показано, что клетки костного мозга *in vitro* и *in vivo* могут дифференцироваться с образованием клеток эндокринной части ПЖ, а также индуцировать регенерацию эндогенных островков у мышей со стрептозотоциновым СД [18].

Применение СК в гепатологии

В эксперименте было показано, что мезенхимальные СК могут дифференцироваться как в мезодермальные клеточные линии (остеобласты, хондробласты, адипоциты, миоциты и кардиомиоциты), так и в немезодермальные клетки, в том числе и гепатоциты [19]. Это свойство МСК было использовано в экспериментах на лабораторных животных с моделированным острым или хроническим поражением печени.

Также есть результаты первых клинических испытаний введения МСК пациентам с циррозом печени. Через 3, 6 и 12 месяцев после трансплантации МСК наблюдалось улучшение лабораторных показателей сыворотки крови (уровень альбумина, билирубина, АЛТ, АСТ, протромбиновый индекс) [20]. Однако требуются дальнейшие исследования для определения механизма действия МСК, необходимой дозы и способа введения, для изучения отдаленных последствий клеточной терапии.

Применение СК в травматологии и комбустиологии

Мезенхимальные стволовые клетки изолировались из костного мозга и дифференцировались в остеобласты в лабораторных условиях уже в 70–80-х гг. XX в. Дальнейшие исследования показали, что эти клетки могут также превращаться в лаборатории и в хондробласты, миобласты и адипобласты.

На сегодняшний день известны несколько направлений лечения травматологических заболеваний стволовыми клетками: артроз суставов, некроз головки бедра, переломы костей (ускорение консолидации перелома).

В комбустиологии СК могут стать альтернативой аутодермопластики в пластическом закрытии обширных ожоговых дефектов. Суспензия культивируемых клеток пациента или донора, или пласты кожи человека, выращенные вне организма и состоящие из кератиноцитов и/или фибробластов, получают в лабораторных условиях и могут быть использованы для лечения ожоговых больных. Помимо закрытия ожоговых кожных дефектов данная методика может применяться при лечении трофических язв, в косметологии, а также для тестирования медицинских и косметических препаратов при проведении испытаний внешних воздействий на кожу [1].

Несмотря на достижения в клеточной терапии различных заболеваний, все еще остается нерешенным ряд важных вопросов.

Использование постнатальных СК имеет ряд преимуществ перед использованием эмбриональных СК (они изложены выше). Однако у данной группы клеток есть и свои недостатки, нерешенные проблемы. Недостаточно изучены факторы дифференцировки постнатальных СК *in vitro*, их трудно получить в достаточном количестве для развития клинического эффекта после трансплантации. Кроме того, с возрастом их количество и терапевтический потенциал уменьшаются [21].

Также до сих пор остается неясным точный механизм действия введенных СК. Многие исследования показали возможность дифференцировки *in vitro* стволовых клеток в тканеспецифичном направлении. Однако в ряде работ указывается, что процент стволовых клеток, попавших в пораженный орган и дифференцировавшихся в «нужном» направлении, был очень невысок и не являлся достаточным для реального терапевтического эффекта. С другой стороны, в некоторых исследованиях говорится об иммуномодулирующем и противовоспалительном эффекте пересаженных СК [22]. Требуется дальнейшие исследования для раскрытия истинного механизма действия введенных СК.

Еще одним важным нерешенным аспектом являются побочные эффекты введения СК, в частности, риск онкогенеза. Некоторые исследователи высказывали предположение о возможной злокачественной трансформации стволовых клеток в процессе деления ввиду хромосомных aberrаций и делеций [23]. В связи с этим необходимо изучение отдаленных последствий (годы) введения СК для решения вопроса о безопасности клеточной терапии.

Также есть сообщения о возможной передаче вирусов (цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, вирус герпеса и др.) от донора к реципиенту при аллогенной трансплантации. Поэтому необходимо проведение скрининга на данные вирусы как донора, так и реципиента с целью профилактики инфекционных осложнений.

Заключение

1. К настоящему времени накоплен значительный опыт как экспериментального, так и клинического использования СК с терапевтической целью при заболеваниях сердечно-сосудистой, нервной систем, эндокринных, аутоиммунных заболеваниях, болезнях опорно-двигательного аппарата, органов пищеварения и др.

2. Все еще остаются многие нерешенные вопросы относительно оптимального источника получения СК, необходимости предифференцировки *in vitro*, оптимальных путей, доз и кратности введения, создания микроокружения с введением цитокинов и ростовых факторов, контроля за пролиферацией и дифференцировкой СК для предотвращения канцерогенеза.

3. Поэтому дальнейшая оптимизация методик выделения, культивирования, способов введения СК, исследование их в организме реципиента и механизмов терапевтических эффектов является актуальным и перспективным направлением в клеточной трансплантологии и регенеративной медицине.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Мезен Н. И. Стволовые клетки : учеб.-метод. пособие / Н. И. Мезен, З. Б. Квачева, Л. М. Сычик. — 2-е изд., доп. — Минск: БГМУ, 2014. — 62 с.
2. Perry, A. R. The history of bone marrow transplantation / A. R. Perry, D. C. Linch // Blood Rev. — 1996. — № 10. — P. 215–219.
3. Appelbaum, F. R. Hematopoietic stem cell transplantation in patients with myelodysplastic syndrome / F. R. Appelbaum, H. J. Deeg // Leuk Res. — 2000. — № 24(8). — P. 653–663.
4. Зуева, Е. Е. Стволовые клетки: некоторые биологические особенности и терапевтические возможности / Е. Е. Зуева, А. В. Куртова, Л. С. Комарова // Гематология. — 2005. — Т. 6. — С. 705–724.
5. The preventive and therapeutic effects of intravenous human adipose-derived stem cells in Alzheimer's disease mice / S. Kim [et al.] // PLoSOne. — 2012. — № 7. — P. 457–462.
6. Systemic treatment with adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorates clinical and pathological features in the amyotrophic lateral sclerosis murine model / S. Marconi [et al.] // Neuroscience. — 2013. — № 248. — P. 333–343.
7. Recovery of behavioral symptoms in hemi-parkinsonian rhesus monkeys through combined gene and stem cell therapy / Y. Zhou [et al.] // Cytotherapy. — 2013. — № 15. — P. 467–480.
8. Changl, K. A. Therapeutic potential of human adipose-derived stem cells in neurological disorders / K. A. Changl, L. Jun-Ho, S. Yoo-Hun // J Pharmacol Sci. — 2014. — № 126. — P. 293–301.
9. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart / C. Toma [et al.] // Circulation. — 2002. — № 105. — P. 93–98.
10. Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity / H. C. Quevedo [et al.] // Proc Natl Acad Sci. — 2009. — № 106. — P. 14022–14027.
11. Percutaneous transvenous cellular cardiomyoplasty: novel non-surgical approach for myocardial cell transplantation / C. A. Thompson [et al.] // J Am Coll Cardiol. — 2003. — № 41. — P. 1964–1971.
12. Strauer, B. 10 years of intracoronary and intramyocardial bone marrow stem cell therapy of the heart / B. Strauer, S. Gustav // Am J Cardiol. — 2011. — Vol. 58, № 11. — P. 1095–1104.
13. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction / S. L. Chen [et al.] // Am J Cardiol. — 2004. — № 94. — P. 92–95.
14. Intramyocardial stem cell injection in patients with ischemic cardiomyopathy: functional recovery and reverse remodeling / A. R. Williams [et al.] // Circ Res. — 2011. — № 108. — P. 792–796.
15. Burns, C. J. Stem cell therapy for diabetes: do we need to make beta cells / C. J. Burns, S. J. Persaud, P. M. Jones // J. Endocrinol. — 2004. — Vol. 183. — P. 437–443.
16. Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages / R. M. Seaberg [et al.] // Nat. Biotechnol. — 2004. — Vol. 22. — P. 1115–1124.
17. Extrapancratic insulin-producing cells in multiple organs in diabetes / H. Kojima [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2004. — Vol. 101. — P. 2458–2463.
18. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration / D. Hess [et al.] // Nat. Biotechnol. — 2003. — Vol. 21. — P. 763–770.
19. Tocci, A. Mesenchymal stem cell: use and perspectives / A. Tocci, L. Forte // Hematol J. — 2003. — Vol. 4. — P. 92–96.
20. Phase I trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis / M. Mohamadnejad [et al.] // Arch. Iran. Med. — 2007. — № 10(4). — P. 459–466.
21. Стволовые клетки. Перспективы их применения в медицине / З. Б. Квачева [и др.] // Медицинский журнал. — 2005. — № 4. — С. 4–6.
22. Transplantation of mesenchymal stem cells for the treatment of liver diseases, is there enough evidence? / P. H. Meier [et al.] // Stem Cell Research. — 2013. — № 11. — P. 1348–1364.
23. Spontaneous transformation of cultured mouse bone marrow-derived stromal cells / Y. F. Zhou [et al.] // Cancer Res. — 2006 — № 66 (22). — P. 10849–10854.