

¹Смолянинов А.Б., ³Жаров Е.В., ²Хурцилава О.Г., ¹Обрезан А.Г., ²Мовчан К.Н., ⁴Ш.Ф. Адылов

Трансплантация стволовых клеток и регенеративная медицина

¹СПб Государственный университет, Медицинский факультет

²СПб Государственная Медицинская академия последипломного образования

³Центр восстановительной медицины, Москва, ⁴Покровский банк стволовых клеток, Санкт-Петербург

Сегодня резко увеличилась средняя продолжительность жизни в большинстве стран мира – это прежде всего Австралия, Великобритания, Германия, США, Швейцария, Япония. Растет продолжительность жизни и в России. В развитых странах увеличивается «общество стариков» и соответственно увеличивается количество заболеваний, связанных с возрастом. Регенеративная медицина становится сильнейшим фактором в преодолении возникших проблем, а технологии применения стволовых клеток – ключом к развитию инновационных методов работы с острыми и хроническими дегенеративными состояниями. Какова же терапевтическая концепция регенеративной медицины, что происходит сегодня?

На данный момент существует три направления регенеративной медицины.

1. «Cell-replacement therapy» (терапия по замене клеток). Учитывая высокую потребность в донорских тканях и органах, которая появилась в связи с активным применением трансплантационной хирургии в мире, возникла концепция создания материала для трансплантации *in vitro*, используя культивирование стволовых клеток (СК) человека.

2. Индукция регенерации. Существуют организмы, способные восстанавливать значительную часть своего тела после повреждения (например, некоторые черви способны восстанавливать даже голову). Соответственно активно изучаются механизмы регенерации на естественных моделях, и ведется поиск молекулярных, физиологических и структурных различий между тканями в процессе эмбриогенеза и заживления ран, а также осуществляются попытки воссоздания эмбрионального (регенеративного) окружения в поврежденных взрослых тканях. Но за последние 10 лет активных исследований в этой области, так и не удалось индуцировать полный регенеративный процесс для тканей человека.

3. Запуск собственных регенеративных процессов организма. Данное направление предполагает изучение СК взрослого организма (adult stem cells). Продолжительность жизни целого организма, естественно, больше продолжительности жизни отдельных клеток. Старые клетки и клетки, гибнущие в процессе различных повреждений, могут заменяться благодаря наличию в организме так называемого пролиферативного гомеостаза. Данные процессы осуществляются в основном за счет СК взрослого организма, но только в строго определенное время, когда замещение клеток необходимо. Тем не менее, были разработаны подходы для запуска пролиферации СК взрослого организма, что может быть применено для создания новых подходов в регенеративной медицине.

СК, которые рассматриваются в качестве ресурсов для регенеративной медицины, можно разделить на три группы.

I. Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), полученные из зародышевых тканей, и эмбриональные зародышевые клетки.

Человеческие плюрипотентные СК могут быть получены из пятидневной бластоцисты. Генетические критерии для плюрипотентных ЭСК бластоцисты:

1. ЭСК получены из бластоцисты или из первичных зародышевых клеток.

2. ЭСК должны поддерживать нормальный кариотип в процессе размножения. ЭСК должны быть иммортализованными и иметь способность к самообновлению своей популяции.

3. ЭСК имеют способность к спонтанной дифференцировке в различные ткани. Они могут давать образования, состоящие из всех трех зародышевых листков *in vitro* и тератомы *in vivo*.

4. ЭСК могут давать все типы клеток в организме, в т.ч., зародышевые клетки, клоны которых могут затем трансплантироваться. Этот критерий не может быть применен к человеческим ЭСК в силу этических причин.

В соответствии с этическими трудностями встает проблема источника человеческих ЭСК. В связи с этим следует отметить, что человеческие и мышинные ЭСК имеют различные сигнальные пути поддержания их плюрипотентности. В случае ЭСК человека определяющим фактором является наличие и продукция FGF (фактора роста фибробластов), активина, а в случае ЭСК животных – LIF (фактор подавления лейкемии) или BMP (белок морфогенеза кости).

II. Стволовые клетки, полученные из пуповинной крови и плаценты.

Пуповина, плацента, амниотическая оболочка и жидкость являются провизорными органами. После рождения ребенка они исчезают. Пуповинная кровь рассматривается как источник гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и используется как альтернативный костному мозгу ресурс СК при лечении гемопоэтических заболеваний. В данном случае исчезают этические проблемы, но ограничение данного метода заключается в малом количестве СК. В тоже время пуповинная кровь и плацента содержат гетерогенную популяцию СК. В пуповинной крови совсем недавно были обнаружены мезенхимальные стволовые клетки (МСК), имеющих более широкое применение, чем ГСК.

III. Соматические стволовые клетки и стволовые клетки гонад взрослого организма.

СК костного мозга. Основное количество СК взрослого человека содержится в костном мозге. Существует догма о фиксированном количестве ооцитов у женщин, однако появились данные, свидетельствующие о возможности пополнения количества ооцитов за счет клеток костного мозга. Таким образом, можно говорить о зародышевых клетках гонад.

СК тканей. Каждая разновидность ткани взрослого организма имеет ограниченное количество СК, которые как раз и играют основную роль в поддержании пролиферативного гомеостаза организма. Такие клетки можно разделить на три группы.

1-я группа: СК с высокой пролиферативной активностью и способностью к переключению с одной линии дифференцировки на другую. Примером таких клеток могут быть эпителиальные СК.

2-я группа: СК с более низкой способностью к переключению, однако, с высоким пролиферативным потенциалом. Это

овальные клетки печени, сателлитные клетки мышечных волокон.

3-я группа: унипотентные СК с низкой пролиферативной активностью. Это СК головного и спинного мозга и СК сердечной мышцы. Физиологическая роль данных СК для взрослого организма до сих пор является предметом дискуссии, т.к. за счет их низкой пролиферативной активности и небольшого количества, они не могут играть заметной роли в регенеративных процессах.

МСК. МСК также присутствуют в различных тканях взрослого организма. МСК могут быть дифференцированы только в ткани мезенхимальной линии дифференцировки, и могут давать ткани следующих органов: мозг, сердце, почки, печень, мышцы, тимус, поджелудочная железа, а также жировая ткань и сосуды. МСК обладают способностью мигрировать к месту повреждения и обеспечивать там процессы регенерации и васкуляризации. В частности МСК способны дифференцироваться в соматические клетки, а так же паракринно активировать эндогенные регенеративные процессы, а также оказывать иммуносупрессорное действие. Изначально предполагалось, что МСК происходят из мезодермы. Сейчас получены данные свидетельствующие о происхождении МСК из нейрального гребня и нейроэпителлия. Существует концепция, согласно которой МСК происходят из разных источников организма. При использовании различных условий культивирования МСК они могут быть идентифицированы как мультипотентные СК, способные дифференцироваться в клетки всех трех зародышевых листков. Первой популяцией таких клеток были мультипотентные клетки-предшественники взрослого организма, которые были способны давать клетки всех тканей организма. Изначально они были получены из костного мозга, затем также из мозга и мышц. Также существуют мультилинейные индуцибельные клетки, полученные из костного мозга, которые по своим свойствам похожи на мультипотентные клетки-предшественники взрослого организма.

Циркулирующие СК костного мозга, мигрирующие при необходимости к месту повреждения и участвующие в регенеративных процессах. Цитокины, генерируемые при воспалении, следующим за инсультом, инфарктом могут прямо или косвенно влиять на мобилизацию СК из костного мозга и вызывать циркуляцию СК в поврежденный участок. Мобилизация СК может активироваться симпатической нервной системой. Самую большую популяцию СК образуют клетки моноцитарно-макрофагального ряда. В процессах регенерации могут принимать участие специфическая популяция клеток крови (CD34+/CD11+b) и фибробласты.

Сегодня уже доказано, что дисфункция системы СК взрослого организма может быть причиной дегенерации тканей и вызывать образование опухолей. Рак – патология, вызванная нарушением пролиферативного гомеостаза, и частота возникновения увеличивается с возрастом. Согласно этой гипотезе рак возникает в результате трансформации СК взрослых тканей. Пролiferация и дифференцировка регулируется и паракринными, и эндокринными факторами. Эти факторы могут ингибировать и регенерационные процессы. Они также могут ингибироваться соответствующим окружением и внутренней дисфункцией СК.

Изменения в функционировании СК ассоциированы с внутренними изменениями их состояния. К основным про-

цессам, вызывающим внутреннюю дисфункцию СК, относят: укорочение теломер хромосом, мутации, а также эпигенетические изменения. Активные формы кислорода, вызывающие нарушения структуры ДНК сокращают функционирование ГСК, особенно у больных пожилого и старческого возраста. Изменения в функционировании СК ассоциированы также со старением эндокринной системы.

Регенеративная медицина и применение клеточных технологий в лечении

Острые и хронические гембласты

При разнообразных гематологических нарушениях, таких как болезнь Ходжкина, различные миеломы, миелопротеративные расстройства, нарушения работы фагоцитов, первичные заболевания иммунной системы, а также некоторые метаболические нарушения широко применяется трансплантация ГСК. Сейчас кроме традиционного костного мозга в качестве источника ГСК все более активно применяется пуповинная и стимулированная периферическая кровь (кровь обрабатывалась предварительно, например, G-CSF для мобилизации СК из костного мозга и увеличения их числа в циркулирующей крови). ГСК, полученные из пуповинной крови, имеют сниженный риск иммунного отторжения при пересадке, но обязательно необходимо проведение HLA-типирования.

Сердечно-сосудистые заболевания

В постнатальную васкуляризацию вносят вклад эндотелиальные клетки-предшественники или циркулирующие СК, происходящие из костного мозга. Также было показано, что ГСК могут стимулировать васкуляризацию за счет выделения ростовых факторов. В некоторых исследованиях было показано, что МСК из костного мозга, пересаженные в поврежденные участки сердца вызвали регенерацию и васкуляризацию сердечной мышцы. Исследования подтверждают возможность применения СК для улучшения/запуска регенерационных процессов миокарда после инфаркта. Степень их воздействия может быть различной, но положительный эффект нельзя отрицать. Существует методика интракоронарного введения мононуклеарной фракции костного мозга при инфарктах миокарда. Сегодня встает вопрос о локальном и целенаправленном введении СК. Это скорее дело техники и ближайшего будущего. Были идентифицированы СК сердца, присутствующие во взрослом организме, но их количество слишком мало для выполнения существенных репаративных процессов.

Заболевания нервной системы

Основными заболеваниями нервной системы, в лечении которых возможно применения СК и регенерационной терапии являются: болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, повреждения спинного мозга, амиотрофический латеральный склероз и некоторые другие виды склерозов. Наибольшей трудностью в данной области применения СК является создание правильного направления сигнала и интеграции при восстановлении нервных структур. Единственным позитивным исключением может быть лечение болезни Паркинсона: для значительного улучшения ситуации иногда достаточно регенерировать допамин-продуцирующих клеток без восстановления нейронов Черной субстанции.

Сахарный диабет первого типа

Данное заболевание является результатом аутоиммунной дегенерации β -клеток поджелудочной железы. Обычное лечение при диабете – строгая диета и поступление инсулина

или его аналогов извне – не может нормализовать процессы обмена углеводов. Соответственно главной целью регенерационной медицины в данном случае является выращивание из СК инсулин-продуцирующих β -клеток *in vitro* для последующей трансплантации путем направленной дифференцировки клеток при их культивировании.

Ортопедические заболевания

При таких заболеваниях как остеопорозы, артриты и переломы костей также могут быть применены подходы регенеративной медицины. МСК из костного мозга могут дифференцироваться в остеобласты, которые играют существенную роль при регенерационных процессах. МСК можно ввести в место травмы (поражения) используя биологически совместимые скафолды, что повышает эффективность такого лечения.

Фармакологические подходы в регенеративной медицине при использовании стволовых клеток

Несколько современных исследований показали, что использование некоторых препаратов позволяет успешно направлять и индуцировать деятельность СК. Некоторые препараты также могут стимулировать внутренние регенерационные процессы.

Рост и дифференцировка эмбриональных стволовых клеток

Ключевым шагом в основанной на применении ЭСК регенеративной медицине является длительное поддержание их самообновления, т.е. поддержание их размножения без дифференцировки. ЭСК могут поддерживаться в таком состоянии в присутствии LIF и BMP. Комбинация этих факторов позволяет поддерживать пролиферацию в отсутствие сыворотки и фидерных клеток. ЭСК человека подвержены апоптотическим процессам и апоптоису больше, чем мышинные, что составляет известные трудности при манипуляциях с клетками, такими как пересев культуры, требующий дезинтеграции клеток. Недавние исследования показали, что ингибитор Rho-ассоциированной киназы Y-27632 снижает апоптотические процессы в культуре СК.

На данный момент существует целый ряд подходов, позволяющих управлять дифференцировкой ЭСК. Например, дифференцировку в нервные клетки можно вызвать обработкой ретиноевой кислотой или используя специфические ростовые факторы в бессывороточной среде и в отсутствие фидерных клеток. Спонтанная дифференцировка ЭСК в кардиомиоциты может быть вызвана ингибированием BMP сигналинга. Дифференцировка в инсулин-продуцирующие клетки требует более комплексного подхода – необходима стимуляция целым рядом эндокринных и паракринных факторов.

Однако до сих пор нельзя сказать, что получены универсальные и действенные подходы для управления деятельностью СК. Мы до сих пор не можем на 100% предсказать направление и время их дифференцировки. Для некоторых клеточных линий до сих пор не существует уникальных маркеров, по которым можно однозначно отличить один тип клеток от другого.

Мобилизация стволовых клеток костного мозга

Мобилизация СК костного мозга – один из ключевых факторов получения СК, клеток-предшественников, макрофагов и моноцитов в местах повреждений, где они могут индуцировать васкуляризацию и поддерживать регенерацию. Самым распространенным методом мобилизации СК на сегодняшний день является инъекция G-CSF, также могут применяться GM-CSF, эритропоэтин, статины, розиглитазон, эстрогены, антагонист рецептора ангиотензина II. Недавние ис-

следования также показали, что в мобилизацию СК вносит определенный вклад и симпатическая нервная система.

Применение стволовых клеток при восстановлении тканей

Несмотря на первоначальные положительные данные о улучшении состояния поврежденного участка сердца после миокарда при обработке G-CSF, двойное слепое исследование с исключением эффекта плацебо не показало никакой позитивной динамики после обработки G-CSF. Однако положительный эффект был показан при совместном действии G-CSF и фактора стволовых клеток (MSC).

Самообновление и дифференцировка популяций стволовых клеток тканей

Данный аспект также является одним из ключевых направлений в регенерационной медицине. Самое важное понятие, какова природа ассиметричного деления СК взрослых тканей. Во взрослых тканях СК находятся в покое состоянии, но под действием определенных сигналов (при повреждении данной ткани, инсульте ткани) они могут либо пополнять пул СК организма, тогда происходит либо симметричное деление, либо давать одну дочернюю СК и одну дочернюю клетку-предшественника (т.е. делиться ассиметрично).

Размножение стволовых гемопоэтических стволовых клеток *in vitro*

Комбинация некоторых гемопоэтических цитокинов (тромбопоэтин, интерлейкин 6, SCF и некоторые другие) могут значительно увеличивать пролиферативную активность ГСК, однако ГСК полученные из пуповинной крови подвержены такому воздействию в значительно меньшей степени. Самообновление ГСК стимулируется BMP-, Wnt- и Notch-сигналингами.

Инсульт-индуцированный нейрогенез

Хотя после инсульта и наблюдается инсульт-индуцированный нейрогенез, число новых нейронов (произошедших из нервных СК) значительно меньше числа погибших клеток. Основным направлением фармакологии регенеративной медицины данной области является поиск веществ, стимулирующих нейрогенез. также важно, чтобы вновь образованные нейроны были идентичны прежним и участвовали таким же образом в нейронных сетях. Необходимым условием развития данного направления является подробное изучение процессов размножения, дифференцировки и миграции нервных СК, детальное выяснение механизмов нейрогенеза.

Поиск веществ, стимулирующих нейрогенез, ведется в основном среди ростовых факторов и низкомолекулярных веществ, обладающих гормоноподобным действием. Примером такого вещества может быть 4-аминотиазол, участвующих в процессе нейрогенеза.

Однако до сих пор не возможно системное управление процессами нейрогенеза ростовыми и нейротрофическими факторами, которые могут стимулировать пролиферацию и дифференцировку нервных СК. Тем более, что были зафиксированы значительные побочные эффекты при их применении, такие как сильная боль (BDNF и NGF) или анемия (FGF-2).

Интересно, что некоторые известные лекарства, например антидепрессанты с различными молекулярными мишенями, обладают способностью индуцировать нейрогенез в гиппокампе. Например, было показано, что антидепрессант литиум индуцировал пролиферацию и дифференцировку нервных стволовых клеток в гиппокампе, а также стимулирует продукцию BDNF in

vitro и in vivo. Хотя молекулярный механизм такого действия не изучен. Среди гормонов показана способность стимулировать нейрогенез для эстрогена, пролактина и тиреоидных гормонов, а также для пептида Y и некоторых других.

Инсульт-индуцированный кардиогенез

Раньше предполагалось, что сердце является (как и нервная система) постмитотическим органом, в котором клетки могут только происходить только процессы гибели кардиомиоцитов и гипертрофии оставшихся клеток. Однако в 1998 году появились данные, свидетельствующие о возможности регенерации сердечной мышцы. Таким образом, в сердце также поддерживается пролиферационный гомеостаз за счет стволовых клеток сердца, однако такая физиологическая регенерация не может дать значительное количество новых клеток при повреждениях. Что касается стимуляции пролиферации и дифференцировки клеток-предшественников кардиомиоцитов, то таким эффектом обладают фактор роста гепатоцитов (HGF) и IGF-1. Проллиферация СК сердца стимулируется также ингибитором GSK3b, а дифференцировка – окситоцином и FGF-2.

Остеогенез

В процессе обновления и восстановления кости принимают участие два типа клеток: остеокласты, разрушающие старую ткань, и остеобласты, формирующие новую кость. Для нормального состояния костей два этих процесса должны находиться в динамическом равновесии. При дисбалансе этой системы наблюдается истончение костей, например, при остеопорозе. Было показано, что эстроген стимулирует образование новой костной ткани, соответственно данным гормоном можно регулировать равновесие этих двух процессов, однако было выяснено, что введение дополнительных количества эстрогена может индуцировать развитие рака молочной железы и рака шейки матки. Сейчас в качестве лечения остеопороза предложено использовать селективные модуляторы рецептора эстрогена. Также формирование кости стимулируется паратироидными гормонами. Показан аналогичный эффект и для Wnt-сигналинга.

Регенерация β-клеток островков Лангерганса

Основные источники β-клеток:

1. Неогенез из клеток-предшественников протоков поджелудочной железы.
2. Проллиферация существующих β-клеток поджелудочной железы.
3. Трансдифференцировка СК или клеток-предшественников экзокринной части поджелудочной железы.

Однако также как и сердечная мышца, β-клетки имеют очень ограниченную возможность самообновления. Глюкагон-подобный пептид-1 и связанный с ним белок экседин-4 могут предотвращать диабет путем ингибирования апоптоза β-клеток.

Стволовые клетки раковой ткани

На данный момент одной из основных гипотез возникновения раковых клеток является нарушение функционирования нормальных СК различных тканей. Эти клетки существуют практически в течение всех жизни ткани и, т.о., накапливают большое количество мутаций, которые и могут вызвать их перерождение. Также существенную роль в канцерогенезе играет нарушение основных сигнальных путей.

На данный момент большинство фармакологических подходов сфокусировано на корректировке Wnt-, Shh-, Notch-сигнальных путей. Сейчас активно изучаются такие вещества как циклопамин, глибек и другие низкомолекулярные агенты.

Перепрограммирование стволовых клеток тканей различных органов человека

Накапливающиеся мутации, о которых говорилось выше, а также эпигенетические изменения являются причиной нарушения фенотипической пластичности СК тканей, т.е. способности изменять свои функции в ответ на внешние воздействия. Целью изучения в данной области является определения механизмов возрастных эпигенетических модификаций СК тканей и развитие фармакологических подходов для перепрограммирования некорректного эпигенетического статуса СК стареющих тканей. Решение такой цели невозможно без идентификации биомаркеров для нормальных и раковых клеток.

Недавние исследования показали, что трансфекция взрослых мышечных соматических клеток плазмидами с генами Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4 приводит к тому, что они превращаются в плюрипотентные СК, то есть была показана способность взрослых клеток к перепрограммированию. В данный момент ведутся активные поиски низкомолекулярных биомолекул, с помощью которых можно управлять процессами перепрограммирования клеток.

Сложности регенеративной медицины

1. Большие различия между СК животных и человека, что часто приводит к невозможности применить результаты, полученные на животных, в клинике.
 2. Труднодоступность человеческих СК.
 3. Этические трудности с получением эмбриональных СК.
- Изучение СК и основанные на них технологические подходы открывают целый пласт новых возможностей лечения различных заболеваний. Успехи регенеративной медицины могут значительно повысить уровень жизни и справиться со многими возрастными заболеваниями.

Литература

1. Смолянинов А.Б., Хурцилава О.Г., Жаров Е.В., Кованько Г.М. Роль регистра доноров костного мозга и банков пуповинной крови в современной медицине // АГ-инфо (Информационный журнал по акушерству и генетологии). - № 4, 2007. - С.14-16.
2. Смолянинов А.Б., Жаров Е.В., Мовчан К.Н. и соавт. Клеточные и генные технологии в трансплантационной тканевой инженерии // АГ-инфо (Информационный журнал по акушерству и генетологии). - № 4, 2008. - С.11-19.
3. Смолянинов А.Б., Обрезан А.Г., Адылов Ш.Ф. Гемопоэтические стволовые клетки и преимущества трансплантации пуповинной крови // Медицина XXI век (научно-практический журнал). - № 3 (12), 2008. - С.20-22.
4. Broxmeyer H.E. Cord blood: biology, immunology, banking, and clinical transplantation // AABB Press, Bethesda, Maryland. - 2004. - 455 p.
5. Glucman E., Broxmeyer H.E., Auerbach A.D. et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi anemia by means of umbilical - cord blood from an HLA-identical sibling // N. Engl. J. Med. - 1989, № 321. - P.1174-8.
6. Sakurada K., Fiona M. McDonald, Shimada F. Regenerative Medicine and Stem Cell Based Drug // Discovery Angew. Chem. Int. Ed. - 2008, 47. - P.5718 - 5738.
7. Wagner J.E., Broxmeyer H.E., Byrd R.L. et al. Transplantation of umbilical cord blood after myeloblastic therapy: Analysis of engraftment // Blood. - 1992, № 79. - P.1874-81.
8. Wagner J.E., Kernan N.A., Steinbuch M. et al. Allogenic sibling umbilical cord blood transplantation in forty-four children with malignant and non-malignant disease // Lancet. - 1995, № 346. - P.214-9.