Иванов Д.В., Хадарцев А.А.

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ МЕДИЦИНЕ

Монография

Под редакцией академика АМТН, д.м.н., профессора А.Н. Лищука

УДК 611-013.11; 616-003.9

Иванов Д.В., Хадарцев А.А. Клеточные технологии в восстановительной медицине: Монография / Под ред. А.Н. Лищука.— Тула: Тульский полиграфист, 2011.— 180 с.

В монографии даны основные сведения о современном взгляде на клеточные технологии с позиций восстановительной медицины. Изложены основные понятия применяемые в клеточной биологии. Осуществлён экскурс в историю развития клеточных технологий, который позволяет понять роль советских и российских учёных в данном разделе науки. Описаны разработки авторов по получению и использованию эндометриальных стволовых клеток в восстановительной медицине. Представлен опыт по применению клеточных технологий в лечении поражений сердечно-сосудистой системы, заболеваний печени, метаболических нарушениях и использовании клеточных технологий у спортсменов. Рассмотрены основные законодательные моменты существующие не только в РФ, но и в мире, оказывающие влияние на развитие клеточных технологий.

Издание рассчитано как на специалистов широкого профиля (биологов, клиницистов), так и на не подготовленного читателя.

Рецензенты:

Академик РАМН,

доктор медицинских наук, профессор В.Г. Зилов

Член-корр. РАМН,

доктор биологических наук, профессор Н.А. Фудин

ISBN 978-5-88422-434-6

[©] Иванов Д.В., Хадарцев А.А., 2011

[©] Тульский полиграфист, 2011

ПРЕДИСЛОВИЕ

Стволовые клетки (СК) от взрослого организма клинически используются в лечении гематологических заболеваний, таких как лейкемия, более 40 лет. Эти клетки получают из костного мозга пациента. В последние годы их стали получать из крови пуповинного канатика, жировой ткани и менструальной крови.

СК обладают отличительными от других клеток свойствами, а именно: они недифференцированные, незрелые, способны к пролиферации, самообновлению, превращению в дифференцированные клетки и регенерирующие ткани и, особенно важно, что при делении они всегда дают себеподобную клетку. Имеются два основных вида клеток: эмбриональные и неэмбриональные, к которым относятся, например фетальные клетки. Эмбриональные СК (ЭСК) являются плюрипотентными, потому что они могут дифференцироваться во все типы клеток. В отличие от них неэмбриональные СК являются мультипотентными, так как их потенциал дифференцироваться в различные типы клеток ограничен. Также различие между ними — в превалировании и большем потенциале к спонтанной дифференцировке у эмбриональных, чем у неэмбриональных клеток.

В последние десятилетие активно разрабатывается возможность применения в клинической медицине клеточных технологий. На которые возлагаются большие оптимистические надежды в лечении заболеваний считавшихся ранее не излечимыми. Взлёт научного интереса к данной теме стал возможен после получения эмбриональных СК в 1998 году (Thomson J.A. et al., 1998).

В настоящее время уже получено более 225 линий эмбриональных клеток. В научных исследованиях активно разрабатываются все типы и виды клеток (Трактуев Д.О. и соавт., 2006; Иванов Д.В. и соавт., 2006; Репин В.С. и соавт., 2007; Потапов И.В., Кириллов И.А., 2007; Сухих Г.Т. и соавт., 2007; Бокерия Л.А. и соавт., 2009; Хадарцев А.А. и соавт., 2009; Иванов Д.В., 2009; Сабурина И.Н. и соавт., 2009; Мороз В.В. и соавт., 2009). ЭСК получаются из внутренней клеточной массы бластоцисты, которая формируется через 7 дней после оплодотворения (фертилизации) яйцеклетки. Неэмбриональные СК получают из органов и тканей

после развития трёх зародышевых листков (экто-, мезо-, эндодермы). Основное отличие заключается в том, что неэмбриональные СК коммитированны только на одну линию дифференцировки (Tuch B.E., 2006).

На лабораторных животных исследованы эффекты после применения клеток в коррекции повреждений внутренних органов таких как печень (Киясов А.П. и соавт., 2006; Ярыгин К.Н., 2008; Долгих М.С., 2008; Asahina K. et al., 2006; Lorenzini S., Andreone P., 2007; Ogawa S., Miyagawa S., 2009; Zhou P. et al., 2009; Kung J.W. et al., 2010), поджелудочная железа (Bouwens L., Rooman I., 2005; Roche E. et al., 2006; Zhao Y. et al., 2006; Noguchi H., 2007; Levicar N. et al., 2007; Lee D.D. et al., 2008; Vija L. et al., 2009; Guo T., Hebrok M., 2009; Song W.J. et al., 2009), сердце (Кругляков П.В. и соавт., 2006; Станков Д.С. и соавт., 2010; Parmacek M.S., 2006; Jujo K. et al., 2008; Reinecke H. et al., 2008; Kim H. et al., 2009; Joggerst S.J., Hatzopoulos A.K., 2009; Tang X.L. et al., 2010; Wojakowski W. et al., 2009), сосуды (Потапов И.В., Кириллов И.А., 2007; Eichmann A. et al., 2005; Bailey A.S. et al., 2006; Nakano M. et al., 2007; Yoder M.C. et al., 2007; Otsu K. et al., 2009), а также поражение спинного (Сухих Г.Т. и соавт., 2007; Козлова Е.Н., 2008; Pfeifer K. et al, 2004; Lim P.A., Tow A.M., 2007; Lee K.H. et al., 2007; Cao Q. et al., 2010) и головного мозга (Соколова И.В. и соавт., 2006; Цыб А.Ф. и соавт., 2006; Horita Y. et al., 2006; Taupin P., 2006; Shindo T. et al., 2006; Syková E., Jendelová P., 2007; Srivastava A.S. et al., 2008; Obermair F.J. et al., 2008; Walker P.A. et al., 2009; Srivastava M.V., 2009; Xiong Y. et al., 2010).

Глава І

ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

«За какой бы биологический вопрос ни взялся исследователь — за изучение ли строения живого организма, или за изучение его физиологических отправлений, его эмбрионального развития или даже его болезненных изменений, патологии — всюду, в конце концов, ему придётся считаться с клетками, составляющими организм.» А.А. Максимов.

Впервые в отечественной науке использовал термин «стволовая клетка» профессор кафедры гистологии и эмбриологии Императорской Военно-медицинской академии А.А. Максимов. В 1909 году он сформулировал данное определение в статье, опубликованной на немецком языке «Лимфоцит как общая стволовая клетка разнообразных элементов крови в эмбриональном развитии и постфетальной жизни млекопитающих». Несомненной заслугой А.А. Максимова является то, что он выдвинул положение о СК во взрослом организме, в частности, о стволовой клетке крови.

Необходимо сказать ещё об одном нашем учёном с мировым именем, внёсшим неоценимый вклад в развитие клеточных технологий. Александр Яковлевич Фриденштейн — уникальный учёный и исследователь — в различных областях биологии и медицины. Анализируя работы А.А Максимова в статьях, докладах и лекциях, сопоставляя их с результатами, полученными на моделях селезёночных и агаровых колоний, Александр Яковлевич сформировал у своих современников интерес к кругу этих работ и проблем, поднятых в них, а понятие «СК» широко вошло в научную терминологию. Именно проблемам СК кроветворной ткани были посвящены многие годы в творческой жизни Александра Яковлевича. Полученные данные о пролиферативных и дифференцировочных потенциях впервые выявленной категории стромальных клеток-предшественников позволили

сформулировать понятие о стволовых стромальных клетках кроветворной и лимфоидной тканей (Фриденштейн А.Я., Куралесова А.И., 1971; Friedenstein A.J., 1980).

В 1667 году J.-В. Denis во Франции сообщает о первой попытке переливания крови от овцы человеку. Фактически была выполнена трансплантация ксеногенных клеток. Это одно из первых, зафиксированных по дате событий. На самом деле попытки использования клеток крови были известны намного раньше. Ещё в 12 веке монахи с целью омоложения вводили себе кровь молодых послушников, получая при этом «омолаживающий эффект».

В 1884 году Вильяме подкожно имплантировал больному сахарным диабетом фрагменты ткани поджелудочной железы овны.

1889 год — Чарльз Эдуард Броун-Секар (1817–1894) предположил, что «слабость пожилых мужчин обусловлена снижением функции яичек». Он активно развивал свою идею и в возрасте 72 лет как истинный исследователь сделал себе подкожную инъекцию экстракта из тестикул собаки и морской свинки, после чего на заседании Французского научного общества сообщил о значительном улучшении физического самочувствия.

В 1890 году Томсон в Нью-Йоркском университете провёл эксперименты по пересадке клеток головного мозга от кошки собаке.

В 1906 году была выполнена первая успешная пересадка роговицы.

В 1907 – первое успешное переливание АВО-совместимой крови.

В 1922 году в США надпочечники плода были пересажены двум пациентам с болезнью Аддисона, после чего наблюдали длительный терапевтический эффект. Надо отметить, что это были пересадки фетальной абортной ткани.

Во Франции в 20-х годах прошлого века врач С. А. Воронов использовал в этих целях экстракты яичек шимпанзе. Существует версия, что именно С.А. Воронов послужил прототипом профессора Преображенского в известном романе М.А. Булгакова «Собачье сердце». Ещё одной интересной деталью в «Собачьем сердце» являются операции по омоложению. Анализ научно-

популярной и общественно-политической литературы 1920-х годов показал, что операции по омоложению – это не фантастика, а одна из самых ярких примет того времени (Мягков Б., 1957). Михаил Афанасьевич Булгаков был по образованию врач, причем с очень обширной клинической практикой. В его отчетах за период работы земским врачом отмечено, что за год он принимал 14000 пациентов. Он очень тщательно изучал материалы, касающиеся проведения «операций по омоложению». За хирургическими уточнениями писатель обращался к своему киевскому другу и врачу Н.Л. Гладыревскому, который работал в Москве в клинике профессора А.В. Мартынова, ещё в 1924 году в своей больнице осуществившего несколько опытов по омоложению.

В 1928 году в Италии была произведена первая безуспешная пересадка поджелудочной железы пациенту с инсулинозависимым сахарным диабетом. Начавшаяся в середине XX века эра успешной пересадки органов надолго приостановила фундаментальные и прикладные разработки с трансплантацией соматических клеток.

В 1931 году П. Ниханс в Швейцарии спас от смерти пациентку, которая после ошибочного удаления околощитовидной железы находилась в коматозном состоянии. Он получил патент на заморозку функционально полноценных клеток животных. В дальнейшем терапия с помощью замороженных клеток животных получила его имя. Интересно, что в данный промежуток времени П. Ниханс разрабатывал метод получения растворимого кофе из замороженного сырья для компании «Nestle».

времени 11. Ниханс разраоатывал метод получения растворимого кофе из замороженного сырья для компании «Nestle».

Приказ Министра Здравоохранения СССР Смирнова С.А. «О широком внедрении в клиническую практику методов академика Филатова, разработанного в 1932 году» датируется 1 февраля 1951 года. Известен этот приказ тем, что является одним из первых и единственным приказом, в котором было чётко прописан алгоритм получения фетальных тканей и их применения в клинике.

В 1951 году – первая демонстрация выживаемости летально облучённых животных после трансплантации костного мозга, которую выполнила группа учёных под руководством Lorenz

(Cell Therapy-Technologies, Markets and Companies. «JainPharmaBiotech», 2005).

В середине 50-х годов Е. Thomas сделал пересадку костного мозга после радиационного лечения острой лейкемии. Донором костного мозга выступила сестра-близнец. В это же время разрабатывается метод криопресервации костного мозга человека.

1958 год — G. Маthe произвёл трансплантацию костного мозга облучённым физикам-ядерщикам. Она потерпела фиаско из-за отсутствия иммуносупрессии, а совместимость определялась только по группам крови.

В 1961 году выполнена первая пересадка фетальных гематогенных предшественников двум пациентам с апластической анемией.

В 60–70-х годах разработаны методы криопресервации спермы и опубликованы первые положительные результаты искусственного осеменения (Edwards R.G., Brody S.A., 1995).

С 1966 — волна операций по пересадке поджелудочной железы, предпочтение отдавалась фетальной поджелудочной железе из-за большого количества эндокринной ткани. В это же время начинаются попытки трансплантации изолированной эндокринной ткани, как более эффективной технологии лечения больных диабетом (Шумаков В.И. и соавт., 1995).

В 1965–1970 гг. сразу в нескольких лабораториях научились выделять островки Лангерганса грызунов.

В 1968 году группой профессора Е.D. Thomas выполнена первая успешная трансплантация HLA-совместимого костного мозга больному лейкемией (Buckner C.D. et al., 1970).

В 1972 году W.F. Ballinger и Р.Е. Lacy экспериментально обосновали эффективность трансплантации островковых клеток поджелудочной железы для лечения сахарного диабета (Cell Therapy-Technologies, Markets and Companies. «JainPharmaBiotech», 2005).

В последующие 10 лет в США, СССР, Канаде и Европе стали чаще появляться сообщения об успешной пересадке островковых клеток пациентам, приводящей к временной, а иногда и к устойчивой ремиссии (Шумаков В.И. и соавт., 1995).

В 1975 году была осуществлена первая успешная пересадка стволовых гемопоэтических клеток фетальной печени при наслед-

ственном ADA-дефиците — отсутствии фермента аденозиндезаминазы в клетках иммунной системы (Репин В.С., Сухих Γ .Т., 1998).

В 1981 году М.Л. Evans и М.Н. Kaufman выделили эмбриональные СК из бластоцисты мыши. G.R. Martin вводит понятие «эмбриональная СК». Дальше в многочисленных работах демонстрируются плюрипотентные возможности дифференцировки обнаруженных клеток и возможности их применения для клеточной трансплантологии (Evans M.J., Kaufman M.H., 1981).

В 1985 году шведские неврологи опубликовали первые положительные результаты лечения болезни Паркинсона пересадкой хромаффинной ткани фетальных надпочечников в стриатум (Backlund E.O. et al., 1985). Оказалось, что донорские ДОФАпродуцирующие клетки способны контролировать гиперкинез и другую симптоматику заболевания у пациентов, не реагирующих на лекарственную терапию. С тех пор клеточные пересадки шаг за шагом развиваются в медицине многих стран мира, когда прекращаются стандартные медицинские услуги по страховке. Пересадки гематогенных и мезенхимальных СК стали регулярной медицинской услугой в гематологии, онкологии, в случае некоторых иммунодефицитов (Репин В.С. и соавт., 2007).

пересадки гематогенных и мезенхимальных СК стали регулярной медицинской услугой в гематологии, онкологии, в случае некоторых иммунодефицитов (Репин В.С. и соавт., 2007).

В 1986 году проходит первое клиническое испытание трансплантации островковых клеток поджелудочной железы больным сахарным диабетом (Cell Therapy-Technologies, Markets and Companies. «JainPharmaBiotech», 2005). В последствии руководитель группы Paul Lacy становиться основателем Общества Клеточной Трансплантации (Cell Transplant Society).

В 1988 году во Франции проведена первая успешная трансплантация клеток пуповинной крови 5-летнему мальчику, страдающему от анемии Фанкони (Gluckman E. et al., 1989).

В 1989 году J. Touraine совместно с коллегами осуществили внутриматочную трансплантацию СК фетальной печени в развивающейся зародыш человека, имплантированный в матку. В результате предотвратили развитие семейной талассемии у детей. В 1991 году опубликованы данные о лечении 28 пациентов

В 1991 году опубликованы данные о лечении 28 пациентов с наследственными дефектами метаболизма (болезнь Гоше, Фабри, Нимана-Пика, болезни «накопления» и др.) путем трансплантации фетальных донорских клеток печени в зародыш in utero (Репин В.С., Сухих Г.Т., 1998).

В 1992 году – первые трансплантации гепатоцитов больным с печеночной недостаточностью (Mito M. et al., 1992).

В 1996 году — первая клеточная генотерапия в клинике — трансплантация аутологичных гепатоцитов, трансфецированных геном рецептора липопротеидов низкой плотности детям с семейной гиперхолестеринемей (Raper S.E. et al., 1996). В этом же году начинаются клинические испытания по лечению рассеянного склероза аутологичными гемопоэтическими клетками (Fassas A. et al., 1997).

В 1998 году J.A. Thomson et al. описали алгоритм выделения эмбриональных СК из бластоцисты человека (Thomson J.A. et al., 1998). В этом же году осуществлена первая в мире трансплантация клеток аутологичной пуповинной крови из частного банка (Ferreira E. et al., 1999).

В 2001 году впервые опубликованы данные по введению клеток в сердце человека для лечения сердечной недостаточности после инфаркта миокарда (Menasche P. et al., 2001).

В 2001 году Джорж Буш накладывает запрет на исследование в области эмбриональных СК в США по политическим и религиозным соображениям.

В 2002 году опубликованы результаты лечения детей с нарушенным остеогенезом с помощью аллогенных мезенхимальных (стромальных) клеток костного мозга (Horwitz E.M. et al., 2002).

В России в 2000–2004 годах бурный расцвет применения различных видов клеток в клинической практике. Появляется большое количество публикаций в прессе противоречивого характера о результатах применения клеток.

В 2004 году корейский учёный W.S. Hwang (2004) получил линию аутологичных эмбриональных СК человека с помощью переноса ядра соматической клетки.

31 декабря 2004 года Приказ Минздравсоцразвития от 31 декабря 2004 г. № 346 «Об организации выдачи разрешений на применение медицинских технологий». Данный приказ сделал практически невозможным получение лицензии на применение клеточных технологий в клинике.

В 2005 году — создание индивидуальных линий эмбриональных СК методом переноса ядра соматической клетки пациента (Hwang W.S., Poh S.I. et al., 2005).

В 2005 году в России начинаются массовые проверки всех медицинских учреждений, в которых выполнялись клеточные трансплантации. Возбуждаются уголовные дела, накладываются административные взыскания за нарушения в работе медицинских учреждений с использованием клеточных технологий.

В 2008 году А.J. French et al. впервые воспроизвели начальные этапы клонирования человека с использованием метода SCNT (перенос ядра соматической клетки).

В марте 2009 года президент США Барак Обама объявил об отмене запрета на финансирование из федерального бюджета исследований эмбриональных СК.

В апреле 2009 года в России сформирована рабочая группа по доработке проекта и концепции технического задания проекта Федерального закона «О применении биомедицинских технологий в медицинской практике»», согласно Приказу №80, подписанному Министром здравоохранения и социального развития РФ Голиковой Т.А.

В 2010 году появляются несколько законопроектов о регламенте применения клеточных технологий в РФ (Иванов Д.В. и соавт., 2010).

Кратко описанные в хронологическом порядке события так или иначе повлияли на развитие клеточных технологий в мире и в России. Сейчас можно говорить о новом витке развития событий с позитивной тенденцией.

Глава II

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

Клеточная терапия только сейчас начинается выделяться в самостоятельную науку, которую пока ещё не преподают в медицинских образовательных учреждениях России. Как наука, клеточная терапия замыкает на себе сразу несколько больших разделов медицины: гистологию, физиологию, иммунологию, хирургию, терапию, эндокринологию и, естественно, биологию развития. Большое количество новых терминов и понятий, возникающих с развитием клеточных технологий, начинает вводить в затруднение даже врачей, которые общаются с биологами, работающими с культурами клеток. Чётко прописанные понятия и определения дают возможность легко и быстро разобраться в данной ситуации и играют важную в роль в понимании происходящих процессов. Можно привести несколько достаточно устоявшихся основных терминов клеточной терапии.

В настоящей монографии, если по контексту не требуется иного значения, приведённые ниже термины имеют значение, указанное напротив каждого из них:

Клетка (англ. – cell) — основная структурно-функциональная единица всех живых организмов, окружённая мембраной. Клетка является элементарной (простейшей) живой системой, которая (в отличие от вирусов) способна самостоятельно воспроизводиться.

Стволовые клетки, СК (англ. – *stem cells*) – группа клетокпредшественников, обладающих способностью к самообновлению и дифференцировке в специализированные ткани.

Эмбриональные СК, ЭСК (англ. – embryonic stem sells) – а) плюрипотентные – клетки эмбрионов и внезародышевых оболочек до имплантации (с 11 дня после оплодотворения); б) клетки эмбриона с постимплантационного периода до 9 недели, способные дифференцироваться в целостный орган или тканевую структуру.

Эмбриогенез (англ. – *embryogenesis*) – 1) в эмбриологии – развитие организма от оплодотворения до рождения; 2) в акущерстве – период внутриутробного развития (первые 8 недель),

в течение которого преобладают процессы формирования основ организации и закладки органов.

Постнатальные СК (англ. – postnatal stem cells) – обозначаются клетки, находящиеся в организме после родов. Они локализуются в костном мозге, пуповинной крови, а также в других органах и тканях, способные трансформироваться в разные типы клеток (мультипотентные клетки).

Гемопоэтические СК (англ. – hemopoietic stem cells) – находящиеся в кроветворных органах и крови, способные давать начало различным росткам кроветворения.

Мезенхимальные (стромальные) СК, МСК (англ. – *stro-mal stem cells*) – СК, находящиеся в костном мозге, жировой ткани, обладающие способностью к дифференцировке в остеобласты, хондроциты, теноциты, адипоциты, миобласты, фибробласты.

Репродуктивное клонирование (англ. – *reproductive cloning*) – клонирование с целью создания нового организма, генетически идентичного исходному.

Клонирование (англ. – cloning) – искусственное создание копий, генетически идентичных исходным: ДНК, клеток, тканей, организмов.

Клон (англ. - clon) - линия клеток, генетически идентичных клетке, от которой они происходят.

Аллогенные клетки (англ. – *allogenic cells*) – клетки, относящиеся к другой особи того же биологического вида. Например: клетки от человека к человеку.

Аутологичные клетки (англ. – $autologus\ cells$) – собственные клетки пациента.

Ксеногенные клетки (англ. – *xenogenic cells*) – гетерологичные клетки, полученные от представителя иного, чем реципиент вида; (npum.aвторов к примеру, для человека это клетки свиньи).

Индуцированные плюрипотентные СК (на английской аббревиатуре «iPS») репрограммированные с помощью четырёх транскрипционных факторов дифференцированные клетки.

Зигота (англ. – *zygote*) – диплоидная клетка, образующаяся при слиянии мужской и женской гамет.

Бластоциста (англ. – blastocyst) — ранняя стадия развития зародыша, предшествующая гаструле, имеет форму пузырька.

Внутренняя клеточная масса (англ. – *inner cell mass, ICM*) – скопление истинно СК в бластоцисте, ранней стадии развития эмбриона.

Фетус (англ. – fetus) — плод, нерожденный организм. У человека, называется с 9 недели после зачатия и до момента рождения.

Фетальные СК (англ. – *fetal stem cells*) – клетки полученные из фетуса.

Ткани (англ. – tissue) – совокупность гистологических элементов (клеток и элементов межклеточного вещества).

Орган (англ. – *organ*) – любая часть тела выполняющая специфическую функцию.

Клеточные технологии (англ. – $cell\ technology$) – биомедицинские технологии с использованием клеток и клеточноинженерных конструкций.

Клеточная терапия (англ. – *cell therapy*) – применение различных видов клеток в лечении заболеваний человека.

Соматические клетки (англ. – somatic cells) – все клетки организма, формирующие тело и не являющиеся половыми клетками.

2.1. Эмбриогенез

Формирование пространственной организации эмбриона в основном изучалось на шпорцевой лягушке *Xenopus laevis*, зародыши которой являются удобными объектами для экспериментов. Процесс эмбриогенеза позвоночных разделяют на три периода:

- 1. Дробление оплодотворённого яйца на множество мелких клеток, которые формируют слой наподобие эпителия.
- 2. Гаструляция и нейруляция, последовательные взаимосвязанные процессы в результате которых происходит образование полости первичной кишки и нервной трубки. В результате гаструляции полая сферическая бластула превращается в трёхслойную структуру: внутренний слой, т.е. стенку первичной кишки, называют энтодермой, наружный слой, который так и остался 14

снаружи — эктодермой, а между ними промежуточный рыхлый слой ткани, состоящей из первичной и вторичной мезенхимы — мезодермой. Эти три первичных зародышевых листка, характерные для всех высших животных. Организация трёхслойного эмбриона в общих чертах соответствует организации взрослого животного с пищеварительной трубкой внутри, эпидермисом снаружи и органами соединительнотканного происхождения между ними (Fink R.D., McClay D.R., 1985). Процесс образования нервной системы из эктодермы называется нейруляцией. Трубка, образовавшаяся из эктодермы, называется нервной трубкой, из которой в процессе дальнейшего развития возникает спинной и головной мозг.

3. Органогенез, в результате которого возникают различные органы и части тела. В процессе пространственной организации зародыша, клетки перемещаются, принимают определённые позиционные значения, определяемые адгезионными свойствами их поверхности, а также их внутренним химизмом. Клетки одного типа стремятся взаимодействовать между собой и отделяются от иных, отличающихся от них клеток. Таким образом происходит стабилизация пространственной организации и обеспечивается способность клеток к спонтанной сортировке при их искусственном смешивании. Изменение характера адгезионных свойств лежит в основе морфогенетических процессов. Поскольку характер позиционных значений данного класса клеток проявляется через изменение свойств клеточной поверхности, он может управлять миграцией других популяций эмбриональных клеток в процессе сборки сложных тканей или органов.

Эти периоды не имеют чётких границ и могут в значительной степени перекрываться (Browder L.W., 1986).

2.2. Классификация клеток

В связи с увеличивающимся интересом к клиническому применению СК, практикующим врачам необходимо знать, при каких заболеваниях эти клетки могут быть использованы, поэтому нами была разработана собственная классификация различных видов клеток, ориентированная на практическое применение в клинической практике.

Вид клеток:

- 1. По срокам развития:
 - а. Эмбриональные
 - b. Фетальные
 - с. Постнатальные
 - і. Пуповинная кровь
 - іі. Клетки взрослого организма
- 2. По отношению к реципиенту
 - а. Собственные (аутологичные)
 - b. Донорские
 - і. Аллогенные (фетальные, пуповинной крови и др.)
 - іі. Ксеногенные
- 3. По фенотипу
 - а. Гемопоэтические
 - b. Мезенхимальные (стромальные)
 - с. Нейрональные

При написании работы мы опирались на данную классификацию.

2.3. Эмбриональные клетки

Эмбриональные клетки – клетки, получаемые из эмбриона. У человека эмбриональный период длится до конца 8-ой недели внутриутробного развития. С 9-ой недели, когда уже все главные органы и структуры сформированы, начинается фетальный период, т.е. эмбрион считается фетусом. Наибольшим вниманием у исследователей пользуются эмбриональные СК (ЭСК), которые получают из внутренней клеточной массы бластоцисты. Именно на ЭСК возлагается мечта человечества о неисчерпаемом источнике жизни. Человеческие ЭСК были выделены в 1998 году (Thomson J.A. et al., 1998; Reubinoff B.E. et al., 2000), что окончательно сделало регенеративную медицину и конструирование тканей реальной возможностью для лечения заболеваний человека в будущем. ЭСК обладают тотипотентностью - способностью дифференцироваться в любые клетки организма. Самое понятие СК подразумевают такой вид клеток, при делении которых возникает точно такая же СК и вторая клетка, способная к дифференцировке в специализированную клетку.

Фетальные клетки - клетки, получаемые на определённом

Фетальные клетки — клетки, получаемые на определённом этапе развития организма, в частности у человека в период с 9-ой до рождения. Фетальные клетки на этапах развития проходят от плюрипотентных способных давать множество разных типов дифференцированных клеток в определённом типе ткани до унипотентных клеток, т.е. способных давать строго определённые типы конечных дифференцированных клеток.

Постнатальные клетки — клетки, получаемые после рождения организма. Сюда относятся клетки пуповинной крови, которые получают из пуповинного канатика, соединяющего мать с ребёнком. Также к постнатальным клеткам относятся все клетки взрослого организма, которых в настоящее время насчитывается более 225 видов. Для примера, специализированные клетки кожи — фибробласты, клетки печени — гепатоциты, клетки сердца — кардиомиоциты и т.д. клетки сердца – кардиомиоциты и т.д.

По отношению к реципиенту клетки разделяются на аутологичные, т.е. собственные клетки, и донорские. *Аутологичные* клетки получаются из собственных тканей реципиента, например крови, жира, кожи и обладают антигенами соответствующими антигенам реципиента, что позволяет им преодолевать процесс отторжения.

Донорские клетки подразделяются на аллогенные и ксеногенные. Аллогенные – клетки относящиеся к другой особи того же биологического вида. Т.е. в отношении человека это клетки от другого человеческого органа или ткани. К данному типу клеток относятся фетальные клетки, клетки пуповинной крови, донорская кровь. *Ксеногенные клетки* – клетки, получают от представителя иного, чем реципиент, вида. Для человека *ксено- сенные клетки* — это клетки от свиньи, кроликов, овцы и т.п.
Они несут на себе большое количество чужеродных белков, что приводит к выраженным иммунологическим реакциям, в частности отторжения.

2.4. Гемопоэтические СК

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) дают начало гранулоцитарным, моноцитарным, эритроидным, мегакариоцитарным и лимфоидным колониям. Однако наибольший интерес представляют ГСК, которые развиваются следующим образом.

У эмбриона гемопоэз начинается в желточном мешке, но по мере развития эта функция переходит к печени плода и, наконец (после 20-ой недели внутриутробного развития у человека), к костному мозгу, где и продолжается в течение всей жизни. ГСК, дающая начало всем элементам крови, плюрипотентна и заселяет другие гемо- и лимфопоэтические органы и самовоспроизводится, превращаясь в новые СК. ГСК характеризуются экспрессией CD34 и Thy1(CD90) и отсутствием CD38, CD33, и HLA-DR (Baum C.M. et al., 1982; Craig W. et al., 1993; Sutherland H.J. et аl., 1989). ГСК также не имеют экспрессии большого количества маркеров характерных для зрелых клеток крови и это важный фактор, благодаря которому идентифицируют и изолируют клетки. *CD34* – это трансмембранный гликопротеин, экспрессируемый не только юными гемопоэтическими клетками, но и фибробластами и сосудистым эндотелием. У человека CD34 является маркером стволовых и прогениторных клеток. Необходимо отметить, что ГСК экспрессируют адгезионные молекулы такие как *L*-селектин (Sackstein R., 1997) и интегрин (Coulombel L. et al., 1997), а также хоумингассоциированную молекулу клеточной адгезии (H-CAM) (Deguchi T. et al., 1999). В последнее время ГСК изолируют с помощью эндоглина (CD150).

2.5. Мезенхимальные СК

Мезенхимальные СК (МСК) — это прогениторные клетки, способные дифференцироваться в мезодермальные ткани, включая остеобласты, хондроциты, адипоциты. В большинстве случаев их получают из костного мозга, а также из большого разнообразия взрослых и фетальных тканей.

Фенотипически МСК экспрессируют маркеры, некоторые из которых, к сожалению, не являются специфическими маркерами. Общепринято, что взрослые человеческие МСК не экспрессируют маркеры гемопоэтических клеток, такие как СD45, CD34, CD14, или CD11. Они также не экспрессируют костимулирующие молекулы, такие как CD80, CD86, или CD40 или молекулы адгезии CD31 (тромбоцит/эндотелиальной клетки молекула адгезии [PECAM]-1), CD18 (лейкоцит функциональноассоциированный антиген-1 [LFA-1]), или CD56 (молекула адге-

зии нейрональной клетки-I), но они могут экспрессировать CD105 (SH2), CD73 (SH3/4), CD44, CD90 (Thy-I), CD71, и Stro-I а также хорошо известные адгезионные молекулы CD106 (молекула адгезии сосудистой клетки [VCAM]-1), CD166 (молекула адгезии активированного лейкоцита [ALCAM]), межклеточные адгезионные молекулы (ICAM)-1, и CD29 (Haynesworth S.E. et al., 1992; Galmiche M.C. et al., 1993; Pittenger M.F. et al., 1999; Conget P.A., Minguell J.J., 1999; Sordi V. et al., 2005; Le Blanc K. et al., 2003). Существуют работы, которые описывают изоляцию МСК, как человеческих, так и от грызунов (крысы, мыши) используя отбор антител основанный на фенотипе МСК.

Некоторые исследователи используют метод негативной селекции для обогащения фракции МСК, когда удаляются гемопоэтические клетки (Baddoo M. et al., 2003); другая часть исследователей наоборот используют антитела для позитивного выделения MCK (Jones E.A. et al., 2002; Gindraux F. et al., 2007). МСК из разных источников не экспрессируют одинаковых молекул, как на человеческих клетках, т.е., несмотря на то, что человеческие и крысиные МСК экспрессируют *CD34*-, имеются работы, в которых доказана вариабельность экспрессии СДЗ4 на мышиных MCK (Peister A. et al., 2004). В основном считается, что все МСК лишены маркера ГСК СД45 и маркера эндотелиальных клеток *CD31*. Однако, важно отметить, что различия в экспрессии большинства поверхностных маркеров может изменяться из-за секреции дополнительных факторов дополнительными клетками при начальных пассажах и в результате экспрессия in vitro некоторых маркеров МСК может не всегда коррелировать с их экспрессией in vivo (Gronthos S. et al., 2001). Открытие МСК прославило нашего учёного А.Я. Фриденштейна (Friedenstein A.J. et al., 1970). Через некоторое время Pittenger совместно с коллегами описал возможность дифференцировки в трёх направлениях мезенхимальных клеток (Pittenger M.F. et al., 1999).

Прошло 40 лет, и в настоящее время накоплен значительный опыт в исследовании уникальных свойств МСК. Их научились извлекать из множества тканей, обнаружили мультипотентные свойства и способность создавать ткани, т.е. способность к тканевой инженерии, что делает МСК чрезвычайно пер-

спективными для клинического применения. Поэтому клиницистам важно знать основные характеристики и свойства этой популяции клеток.

Маркеры МСК. У МСК есть отличительные особенности, в частности, они хорошо прикрепляются к пластику, способны дифференцироваться в костную, хрящевую и жировую ткани и могут быть выделены из большинства взрослых типов тканей пациента. Однако, даже если их выделять при градиенте плотности, они все равно остаются гетерогенной культурой клеток с разнообразным пролиферативным и дифференцировочным потенциалом. Для применения клеточных технологий в клинике необходима чёткая характеристика маркеров клеток и поэтому делались и продолжают выполняться исследования для идентификации МСК и, соответственно, лучшего выделения их, что особенно важно при выделении клеток из различных тканей. Большинство работ выполнены на МСК полученных из человеческого и мышиного костного мозга, но постепенно увеличивается число работ по исследованию мезенхимальных клеток из других органов и тканей. Отмечено, что имеется небольшое количество вариаций между популяциями клеток, полученных из разных источников.

При определении характеристик клеток есть понятие негативных и позитивных маркеров. Если белковая молекула не определяется на поверхности клетки, то данный маркер считается негативным для клетки и, если происходит экспрессия маркера, то он считается позитивным или положительным.

Негативные маркеры. Принято, что МСК не экспрессируют *CD11b* (маркер иммунных клеток), гликофорин-А (маркер эритроидной линии клеток) и *CD45* (основной маркер гемопо-этических клеток). *CD34* (примитивный маркер ГСК) практически не экспрессируется на человеческих МСК, зато на мышиных — всегда. *CD31* (маркер эндотелиальных и гемопоэтических клеток) и *CD117* (маркер гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток) почти всегда отсутствуют и на человеческих и на мышиных клетках. У биологов, изучающих свойства МСК, нет категоричного позитивного маркера. Обилие сообщений от научных групп об идентификации и характеристиках клеток основывается на использовании различных субпопуля-

ций маркеров. В клинике без чёткой характеристики клеток интерпретация результатов крайне трудна.

Позитивные маркеры. Stro-1 – хорошо и давно известный маркер МСК. Клеточная популяция негативная по маркеру Stro-1 не способна к формированию колоний (Simmons P.J., Torok-Storb B., 1991). Негативная селекция против гликофорина-A совместно с селекцией Stro-1+ (позитивных) клеток резко увеличивает получение клеток из костного мозга – в 10 раз (Gronthos S. et al., 2003). Клетки Stro-1+ могут стать фибробластами, поддерживающими ГСК, гладкомышечными клетками, адипоцитами, хондроцитами и остеобластами (Dennis J.E. et al., 2002). Кроме того, экспрессия Stro-1 различается между двумя популяциями культивированных МСК, которые имели различное происхождение и способность поддерживать ГСК (Bensidhoum M. et al., 2004). Однако указанные выше свойства не делают маркер Stro-1 основным маркером МСК. В частности, он экспрессируется не только МСК, неизвестен также аналог у лабораторных животных (мышей) и, наконец, его экспрессия уменьшается во время культуральных работ, а также использование Stro-1 ограничено в маркировании для изоляции МСК, или идентификации во время ранних пассажей (Gronthos S. et al., 2003). До конца функции антигена Stro-1 ещё не изучены, но использование его с другими МСК-маркерами является тем не менее лучшим вариантом для идентификации.

Другие маркеры МСК – *CD106* или *VCAM-1* (*сосудистая молекула клеточной адгезии*) экспрессируются клетками эндотелия сосудов и прилежащими плотными периваскулярными клетками. Считается, что *CD106* (*VCAM-1*) совместно с *Stro-1* представляют собой отличные маркеры человеческих МСК. *CD73* является 5′-нуклеозидазой и стимулируют адгезию лимфоцитов к эндотелию. Способность данной молекулы долго экспрессироваться в культуре относит его к маркеру МСК (Haynesworth S.E. et al., 1992). Имеется много других маркеров, которые экспрессируются МСК, однако они не выносятся на первое место из-за недостаточного постоянства экспрессии. К ним относят *CD105*, *CD90*(*Thy-1*), *CD44*, *CD29*, *CD13*, *Flk-1*(*CD309*), *Sca-1*, and *CD10*.

Таким образом, можно сказать, что МСК типично негативны, т.е. не экспрессируют *CD34*, *CD45*, *CD14*, *CD11b*, *CD19*, *CD79a*, and *HLA-DR* и, наоборот, позитивны, т.е. экспрессируют *Stro-1*, *CD29*, *CD73*, *CD90*, *CD105*, *CD166*, и *CD44* (Abdallah B.M. et al., 2005; Foster L.J. et al., 2005; Dominici M. et al., 2006; Keating A., 2006).

При анализе дифференцировки СК очень важную роль играет их тканевое происхождение. В настоящее время уже стала рутинной методика получения МСК из костного мозга, а также из тканей мезодермального происхождения, т.е. жира, мышц, костей и сухожилий. Недавно мультипотентные клетки изолировали и из других тканей не мезодермального происхождения. В частности, проведены работы по получению пластикадгерентных МСК-подобных колоний клеток из головного мозга, селезёнки, печени, почек, лёгких, тимуса и поджелудочной железы у мышей с похожими морфологическими свойствами и иммунофенотипом после нескольких пассажей (Silva Meirelles L., 2006). А в другом исследовании мышиные МСК были получены из свежеизолированных клеток сердца, печени, почек, яичников, кожи на основании CD45-/CD31-/Sca-1+/Thy-1+ фенотипа (Blashki D. et al., 2006). Естественно возник вопрос – во всех тканях существуют специфические ниши для МСК, или они существуют автономно и не зависят от микроокружения. Ответ на данный вопрос появился достаточно быстро. С момента как Schofield в 1978 выдвинул концепцию «ниш» для СК, идея была широко поддержана и получила окончательное подтверждение в последние годы. Ниша представляет собой место или комплекс специфических условий обитания, в котором есть все необходимые элементы окружающие СК, когда они находятся в неактивном состоянии. К этим элементам относятся неСК, которые находятся с СК в контакте, благодаря экстрацеллюлярному матриксу и растворимым в нем молекулам. Из-за такого микроокружения СК находятся в неактивном состоянии, т.е. не дифференцируются. Считается, что определённые сигналы должны дойти до ниш СК и сообщить о необходимости дифференцировки СК для регенерации или репопуляции повреждённой ткани.

Где же располагаются ниши? Одним из мест их расположения является периваскулярное пространство, что было опреде-

лено благодаря экспрессии у МСК, полученных из периваскулярного пространства, гладкомышечного актина (αSMA) и установлении их фенотипа как CD45–/CD31–/Sca-1+/Thy-1+ клетки (Blashki D. et al., 2006). В пользу существования данной ниши, благодаря маркерам *Stro-1* и *CD146*, МСК были обнаружены в выстилке кровеносных сосудов костного мозга и дентальной пульпы (Shi S., Gronthos S., 2003). Эти клетки также экспрессировали αSMA , а некоторые – даже 3G5 маркер, который ассоциирован с клеточной поверхностью перицитов, т.е. экспрессируется перицитами. Некоторые учёные сразу же предположили, что перициты в действительности являются МСК, потому они легко могут дифференцироваться в остеобласты, хондроциты, ади-поциты (Doherty M.J. et al., 1999). Расположение МСК в периваскулярных нишах по всему телу даёт им возможность лёгкого доступа ко всем тканям и уверенность в том, что МСК интегрированы в процессы восстановления большинства различных тканей. Белки трансмембранной клеточной адгезии, кадхерины, функция межклеточной адгезии, миграция, дифференцировка – являются очень важными в биологии МСК. Все это тесно связано с биологией ниш других СК (Grayson W.L. et al., 2006). Продолжает оставаться в зоне научного интереса исследование молекулярных основ взаимодействия между МСК и их «соседями». Важно отметить, что никаких специфических компонентов экстрацеллюлярного матрикса, позволяющего поддерживать МСК в неактивном состоянии, в нишах не выявлено. Однако имеются чёткие доказательства того, что сам по себе экстрацеллюлярный матрикс может регулировать дифференцировку МСК, что имеет потенциал для применения в тканевой инженерии. Например, если удалить все клетки из экстрацеллюлярного матрикса, который образовался на титановой подложке после культивирования остеобластов, то при размещении в нем МСК, увеличивается количество остеогенных маркеров, таких как щелочная фосфатаза и отложения кальция (Datta N. et al., 2005). Создание искусственного матрикса, который может мимикрировать микроокружение *in vivo* и регулировать нужную дифференцировку СК, наверное, самый многообещающий метод для терапевтического применения. Крайне необходима молекулярная информация о взаимодействии матрикса и МСК, наиболее вероятно с использованием интегринов, которая уже применяется в биологии ниш других систем (Campos L.S., 2005).

У всех СК, и, мезенхимальных, в частности, есть особенность или даже явление, которое называется хоуминг. Они приходят в место повреждения и начинают процессы восстановления повреждённых тканей, часть которых имеет способность восстанавливаться некоторое время местными дифференцированными клетками. Как правило, такие клетки находятся в постмитотическом состоянии. Поэтому для прихода стволовых или прогениторных клеток необходимы стимулирующие сигналы. Изучение биологии ниш СК необходимо не только для вылы. Изучение биологии ниш СК неооходимо не только для выявления того, что позволяет долго сохранять СК, но также и причин заставляющих их эмигрировать. Даже у здоровых животных МСК способны к хоумингу не только в костный мозг, но и в лёгкие и мышцы (Francois S. et al., 2006). Способность МСК кажется связанной с возможностью экспрессировать Stro-1, что позволяет позитивным по данному маркеру клеткам мигрировать и приживаться в большинстве изучаемых тканей. Считается также, что зрелые клетки, которые были повреждены в организме, способны секретировать не только сигналы для *хоуминга* (миграции), но и сигналы дифференцировки. К примеру, МСК из костного мозга мышей начинали миогенную дифференцировку в среде из повреждённой мышечной ткани скелетной мускулатуры и оставались неактивными в среде с неповреждёнными скелетными мышцами (Santa Maria L. et al., 2004). Проведённые работы in vitro подтвердили, что некоторые неповреждённые клетки могут индуцировать дифференцировку МСК, когда с ними осуществляется непосредственный контакт. К примеру, клетки печени способны индуцировать гепатогенез (Lange C. et аl., 2005). Важно заметить, что зрелые клетки не всегда индуцируют дифференцировку МСК в своём собственном направлении. Так — непосредственный контакт с хондроцитами индуцирует остеогенез, но не хондрогенез (Gerstenfeld L.C. et al., 2003). Ясно, что окружение вокруг МСК является крайне важным определяющим фактором их идентичности.

Зная основные направления и суть происходящих изменений, клиницисту становиться более понятен алгоритм применения МСК в лечении различных заболеваний. Сейчас продолжа-

ется разработка и поиск основных сигнальных путей и основного регуляторного гена, стимулирующего дифференцировку МСК. Возможность создать биологические стимуляторы для получения желаемой дифференцировочной программы клеток, или возможность блокировать побочные направления дифференцировки, или нежелательные направления — крайне важны в клиническом применении, особенно когда поднимается вопрос о тканевой инженерии или регенерации ткани. Так перестройка рубцово-изменённой ткани миокарда после инфаркта в костном направлении крайне нежелательна, зато необходимо получение кардиомиоцитоподобных клеток для восстановления сократимости повреждённой ткани.

Рассмотрим основные направления и регулирующие факторы хондрогенеза (образования хрящевой ткани». Хондрогенная дифференцировка МСК в лабораторных условиях (при культивировании) воспроизводит механизм образования хряща *in vivo*. Маркеры, экспрессируемые при хондрогенезе, позитивно характеризуют хондроциты, полученные из МСК, включая транскрипционные факторы (sox-9, scleraxis) и гены экстрацеллюлярного матрикса — коллаген 2 и 9 типа, аггрекан, декорин и др. (Baksh D. et al., 2004; Tuan R.S. et al., 2003). Несмотря на полученные данные, специфические сигнальные пути, по которым проходит информация о запуске экспрессии, остаются до сих пор неизвестны. Изучение естественных мутаций в человеческом организме и генетические исследования на молекулярном уровне идентифицировали несколько важных сигнальных молекул, включая *трансформирующий фактор роста в* (TGF-в) (Massague J. et al., 2000), костный морфогенетический белок (BMP), фактор роста и дифференцировки (GDF) (Chen D. et al., 2004). Выполненные работы с использованием рекомбинантных протеинов и аденовирусным инфицированием МСК совместно культивированные с факторами TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 3$, BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-12, BMP-13, и GDF-5 достоверно доказали быструю дифференцировку в хондрогенном направлении МСК, полученных из разнообразных источников мезодермального происхождения (Tuan R.S. et al., 2003). Получается, что используя данное свойство МСК, дифференцировку в хондрогенном направлении их можно применять при восстановлении повреждённой структуры хрящей суставных поверхностей. Данное направление клеточных технологий, используемое в ревматологии совместно с противовоспалительной терапией, благоприятно будет воздействовать на клинические результаты лечения больных с артрозами.

При остеогенезе или формировании костной ткани, главенствующую роль играет белок BMP и, в особенности, BMP-2 и ВМР-6, которые очень сильно стимулируют МСК в остеогенном направлении (Friedman M.S. et al., 2006). Каскад реакций, происходящих с участием генов Runx2, Smurf1, Smurf2 приводит к формированию костной ткани (Jeon E.J. et al., 2006). Ещё одним из важных цитокинов, играющих важную роль в дифференцировке МСК в остеогенном направлении, играет Wnts. В научных работах было доказано, что высокий уровень эндогенного цитокина Wnts ускоряет остеогенез и наоборот, низкий уровень данного цитокина приводит к ингибированию процесса формирования костной ткани (Gaspar C., Fodde R., 2004). Множественные совместные взаимодействия между ВМР белками, иитокинами (Wnts, TNF-а) и генами приводят к стимулированию или угнетению дифференцировки МСК в остеогенном направлении. Поиск новых механизмов и транскрипционных факторов, приводящих к формированию костной ткани из МСК, позволит найти новые программы дифференцировки клеток, что позволит более эффективно использовать их в травматологии.

Адипогенез, или образование жировой ткани. Процесс дифференцировки МСК в адипогенном направлении происходит, когда блокируется остеогенная дифференцировка. Важную роль в данном процессе играет *PPARy* (Nuttall M.E., Gimble J.M., 2004). При недостаточной стимуляции МСК в остеогенном направлении можно получить адипогенную дифференцировку, что клинически будет выражаться в отсутствии эффекта от проводимой клеточной терапии. С другой стороны при блокировании адипогенной дифференцировки можно получить уже костную ткань.

Миогенез, или образование мышечной ткани, является крайне важным и перспективным направлением в дифференцировке МСК. В настоящее время большинство исследований миогенеза из взрослых СК основываются на получении клеток

из скелетной мышечной ткани или сателлитных клеток. Однако уже продемонстрирован эффект стимулирования *миогенеза* из взрослых МСК после трансфекции активированным *Notch 1* (Dezawa M. et al., 2005), правда, не ясен механизм данного эффекта. Существует группа исследователей, которые сфокусированы сугубо на *кардиомиогенезе*. В своих работах они демонстрируют важность межклеточного взаимодействия при сокультивировании МСК и кардиомиоцитов и стимулировании МСК *кардиомиогенеза* на моделях инфаркта миокарда в лабораторных условиях (Li H. et al., 2006). Более глубокие исследования по данному направлению свойств дифференцировки МСК проходят в клинике и лабораториях и их актуальность продолжает оставаться на самом высоком уровне, потому что количество пациентов с поражением миокарда увеличивается год от года.

Теногенез или формирование ткани сухожилий и связок из МСК активно изучается, хотя и является менее значимым по сравнению с кардиомиогенезом. В формировании сухожилий *in vivo* играют важную роль белок *GDF*, а также некоторые белки семейства *TGF-β* (Wolfman N.M. et al., 1997). Зато при культивировании в лаборатории для получения *теноцитов* из МСК необходимы не только специфические ростовые факторы, но и дозированная механическая нагрузка, которая играет крайне важную роль в получении направленных нитей сухожилия (Altman G.H. et al., 2002). Пока остаются неидентифицированными специфические маркеры дифференцировки, приводящие к *теногенезу* из МСК. В настоящее время более менее определена роль белка *scleraxis* (Brown D. et al., 1999) и *R-Smad8* (Hoffmann A. et al., 2006) в теногенной дифференцировке МСК.

Таким образом, взрослые МСК являются самым перспективным кандидатом из всех клеток для восстановительной медицины. Основное требование — это идентификация МСК *in vivo*. На моделях с мышами мечение происходит благодаря генетическим маркерам (Tumbar T. et al., 2004). Асимметричное деление показало способность клеток к самообновлению. Это уникальное свойство СК эксплуатируется для идентификации сателлитных мышечных клеток и может быть использовано для идентификации МСК *in vivo* при изучении их делений. При использовании профиля поверхностных антигенов и генных набо-

ров достаточно один раз чётко выделить и идентифицировать популяцию МСК. Роль каждого компонента системы МСК должна быть чётко проанализирована. Основное направление включает идентификацию сигнальных факторов, которые ускоряют самообновление МСК, а также сигнальные пути, позволяющие запускать линейную дифференцировку. Все последующие исследования будут направлены на изучение систем экспрессии и взаимосвязи между семействами белков, например, TGF- β и Wnt. Идентификация специфических рецепторов на клеточной поверхности, которые активируются сигнальными молекулами, например белками семейства TGF- β (BMP) и Wnt, во время самообновления и цитодифференцировки крайне важны для понимания и, самое главное, для связывания взаимодействия между сигнальными сетями как внутри, так и снаружи клетки. Понимание данных механизмов позволит стимулировать взрослые МСК для восстановления после повреждения.

2.6. Эндометриальные СК

Несмотря на наличие доступа к ЭСК, многие лаборатории выбрали изучение взрослых СК не столько по этическим соображениям, сколько из-за практических аспектов и требований повседневного прогресса, необходимого для развития клеточной терапии. Исходя из относительной простоты изоляции, потенциала экспансии, стабильного фенотипа, транспортабельности, предпочтительными для использования в регенеративной медицине оказались МСК. Это ускорило изучение взаимодействия аллогенных МСК с иммунной системой хозяина, а также возможностей использования МСК в клинической практике (Bobis S. et al., 2006).

К значимым ограничениям широкого использования МСК можно отнести необходимость получения для нужд терапии значительного числа клеток, и желательность их получения как можно менее инвазивным способом. Оба препятствия казались практически непреодолимыми до тех пор, пока сразу несколько групп исследователей не обратило внимания на возможность получения СК из менструальной крови.

Открытие было основано на предположении, что СК могут присутствовать в менструальной крови, так как они были ранее обнаружены в эндометрии (Ferenczy A. et al., 1979; Conti C.J. et al., 1984; Spencer J.A. et al., 2005; Chiba T. et al., 2007). Эндометрий матки человека содержит эндометриальный слизистый слой, который относится к высоко регенерирующим тканям, и располагается миометрии. Эндометриальнона плотном миометриальное сочленение достаточно неравномерное и не имеет подслизистого слоя, отделяющего эндометриальную железистую ткань от находящихся ниже гладкомышечных клеток миометрия (Umezawa A., Makino H., 2008). Эндометрий и субэндометриальный миометрий происходят из Мюллеровских желёз во время эмбриогенеза, в то время как слои миометрия происходят во время фетального периода и развиваются из других источников (Okulicz W.C. et al., 1997; Umezawa A., Makino H., 2008). Эндометрий подразделяется структурно и функционально на две главные зоны, где верхняя, или функциональная, содержит железы, распространяющиеся от поверхности эпителия и поддерживающиеся стромой, и нижняя или базальная, состоящая из базального слоя желёз, плотной стромы и лимфоидных агрегатов (Padykula H.A., 1991; Tabibzadeh S., 1991; Patel A.N. et al., 2008; Umezawa A., Makino H., 2008). Обе зоны как функциональная, так и базальная в дальнейшем подразделяются на два морфологически разных слоя (Biervliet et al., 2004; Kim Y.J. et al., 2007; Meng X. et al., 2007; Patel A.N. et al., 2008), хотя другие исследователи считают различие между 4 слоями менее очевидным и предпочитают концепцию поляризации микроокружения (Thomson J.A. et al., 1998; Umezawa A., Makino H., 2008). Клеточный состав эндометрия включает в себя люминальный и железистый эпителий, стромальные фибробласты, эндотелиоциты и лейкоциты. Эндометрий человека проходит более чем 400 циклов регенерации, дифференциации и отторжения за время репродуктивного периода (Kaiserman-Abramof I.R., Padykula H.A., 1998; Meng X. et al., 2007; Han X. et al., 2009). Каждый месяц 4–7 мм слизистой ткани вырастает в течение 4–10 дней в первой половине пролиферативной стадии менструального цикла (Meng X. et al., 2007). Важно отметить, что концепция регенерации эндометрия подтверждается расположением СК именно в базальном эндометрии, что было установлено много лет назад (Roth E., Taylor H.B., 1966; Padykula H.A. et al., 1989; Patel A.N. et al., 2008). При изучении пролиферации эндометриальных клеток были обнаружены зональные различия, которые показали постепенное замещение эпителиальных и стромальных клеток – прогениторными СК, располагающимися в базальном эпителии в области эндометриально-миометриального соединения (Padykula H.A. et al., 1984; 1989; Fuchs E., Segre J.A., 2000; Cui C.H. et al., 2007). Позже был установлен дисбаланс между индексом пролиферации эндометриальных желёз в базальном и функциональном слоях во время пролиферативной и секреторной фаз цикла у макак при использовании фосфорилированного гистона НЗ, как пролиферирующего маркера (Cervello I. et al., 2007). Такой уровень тканевого новообразования сопоставим с клеточным возобновлением в высокорегенерирующих тканях, таких как кроветворные ткани костного мозга, эпидермис, эпителий кишечника, где взрослые СК замещают выбывающие клетки для сохранения тканевого гомеостаза (Matthai C. et al., 2006; Gargett C.E. et al., 2009). Дальнейшие косвенные доказательства существования эндометриальных стволовых/прогениторных клеток представлены в результатах экспериментальных исследований приматов, и в клинических исследований, когда эндометрий полностью восстанавливался и функционировал во время беременности после почти полностью удалённого эндометриального слоя (Yuan H. et al., 1995; Hida N. et al., 2008). В других клинических исследованиях установлено наличие регенерирующих эндометриальных слоёв у женщин после электрохирургической абляции, применявшейся для лечения меноррагии (Uduwela A.S. et al., 2000), и даже возникновение беременности (Abbott J.A., Garry R., 2002). Клинические исследования подтверждают присутствие взрослых СК в эндометрии. Эти утверждения основаны на получении оссификатов после беременности, источником которых являются не фетальные ткани, а хроническое воспаление и травма (Bird and Willis, 1965). Именно воспаление и травма активизируют включение МСК в регенерацию тканей. Кроме того, такие ткани как гладкая мускулатура, кости и хрящи также обнаруживаются в эндометрии (McLennan C.E., Rydell A.H., 1965; Schwab K.E. et al., 2005; Bobis S. et al., 2006).

Более поздние работы свидетельствуют о возможности изолировать из эндометрия и культивировать 2 типа клеток: эпителиальные прогениторы и МСК (Gargett C.E., 2006). Также сообщается о маркере плюрипотентности Oct-4 (POU5F1), обнаруженном в некоторых клетках стромы человеческого эндометрия (Matthai C. et al., 2006). Поскольку СК были обнаружены в эндометрии, возникло предположение, что они также могут быть обнаружены в отторгаемом вместе с менструальной кровью эндометрии. Но при изучении СК выделенных из менструальной крови (МенСК), оказалось, что они представляют собой неоднородную группу клеток, и некоторые субпопуляции, видимому, отличающиеся от СК, полученных из интактного эндометрия, а также от МСК. Работы Cui et al. (2007), Meng et al. (2007), Patel et al. (2008), P.A. Мусина и соавт. (2008), A. Umezawa, H. Makino (2008), N. Hida et al. (2008) положили начало новому перспективному направлению в получении и использовании МенСК в терапевтических целях.

Ещё 2004 году заявку на выданный в 2006 году патент «СК, полученные из отслоившегося при менструации эндометрия, способ их получения и применение» подала группа российских учёных (Мусина Р.А. и соавт., 2006). Изобретение предусматривает применение отслоившегося при менструации эндометрия для получения СК, т.е. описывает новый источник и способ получения СК из отслоившегося при менструации эндометрия. Согласно изобретению, СК «полученные из отслоившегося при менструации эндометрия, могут быть использованы в косметологии, например для общего омоложения организма, омоложения кожи, лечения и/или укрепления волос; в стоматологии, например для лечения и/или укрепления дёсен и/или лечения и/или коррекции зубов; в травматологии, например в терапии ожогов, ран, повреждений кожи и/или переломов; и в терапии дегенеративных заболеваний, например невралгии, диабета, сердечно-сосудистых заболеваний, ишемической болезни сердца или конечностей, воспалительных заболеваний и заболеваний кожи, а также для создания банка СК».

Но текст данного документа в широкой печати не публиковался. Первыми представили работу, описывающую выделение клеток эндометрия из менструальной крови, Cui et al. (2007).

Причём в этом исследовании процедура получения МенСК носила сугубо прикладной характер: авторы просто использовали этот метод для получения МСК эндометрия, опираясь на общеизвестный факт, что в менструальной крови содержатся клетки отторгающегося эндометрия. Сама работа посвящалась изучению возможности экспрессии человеческого дистрофина. Они успешно культивировали множество первичных клеток, изолированных из менструальной крови, и обнаружили как минимум 2 морфологически разные группы: маленькие веретенообразные клетки и большие палочкообразные.

Уникальный фенотип МенСК был связан с гистологическими и эмбриологическими отличиями эндометрия (Du H., Taylor H.S., 2007).

Мепg et al. (2007) выделяли из менструальной крови мононуклеарные клетки, и изучали субпопуляцию прилипающих клеток. Выделенные клетки оказались способны выдерживать в тканевой культуре более 68 удвоений без нарушений кариотипа. Индекс пролиферации был значительно выше, чем у контрольной культуры МСК пуповинной крови, удвоение после 20 удвоений наступало каждые 19,4 часа, в сравнении с 1,5–2 сутками у двух контрольных линий пуповинной крови. Была обнаружена способность выделенных СК дифференцироваться в клетки 9 линий всех трёх зародышевых листков: мезодермальные — миоциты, остеоциты, эндотелий, адипоциты, кардиомиоциты; эктодермальные — нейрональные клетки; и эндодермальные — гепатоциты, панкреатические клетки, клетки дыхательного эпителия. Дифференцировка была подтверждена иммуногистохимически: образовавшиеся тканевые клетки экспрессировали соответствующие этим тканям маркеры. Клетки, находившиеся в контрольной среде, без дополнительной стимуляции, не экспрессировали маркеры дифференциации. После 68 удвоений клетки сохраняли способность продуцировать присущий им ряд маркеров. Кроме этого, полученные клетки продуцировали ММР3, ММР10, GM-CSF, angiopoetin-2, и PDGF-BB в 10 раз больше, чем 2 контрольные линии МСК пуповинной крови.

Обнаружены следующие особенности СК, выделенных из менструальной крови:

- 1) высокий индекс пролиферации в сравнении с контрольными линиями МСК пуповинной крови
 - 2) отсутствие способности экспрессии маркера МСК STRO-1
 - 3) способность к экспрессии маркера ЭСК Ост-4
 - 4) высокая экспрессия матричных металлопротеаз

Выделенные клетки не экспрессируют свойственные эндометриальным СК маркеры *CD*34 и *CD*45.

Раtel et al. (2008) также обнаружили высокую скорость удвоения МенСК, которая составляла 24—36 часов. Из начальных 50000 клеток за 26 дней было получено 48000000 клеток. Клетки оставались диплоидными, без хромосомных аберраций, как было установлено при определении кариотипа на 12 пассаже. Более того, *RT-PCR* анализ показал, что МенСК на 12 пассаже экспрессируют мультипотентный маркер *Oct-4*, но не *SOX-2* или *Nanog*.

Полученные группой Patel данные об экспрессии маркеров принципиально различаются от данных, опубликованными группами Cui и Meng по позитивной реакции на экспрессию плюрипотентного маркера SSEA-4 и c-kit (CD117), которые также были колокализованы на изолированном клоне MehCK. Была обнаружена экспрессия маркеров CD166, CD49f, MHCI, и умеренная экспрессия CXCR4, ответственного за xoymuhc CK. Негативная реакция отмечена на маркеры MHC II и LIN.

МенСК, исследованные группой Patel, дифференцировались в клеточные линии: *мезодермальные* – адипоциты, хондроциты, остеоциты, кардиомиоциты; *эктодермальные* – олигодендроглия, астроциты.

МенСК сохраняли более чем 50 % теломеразной активности даже на 12 пассаже при сравнении с ЭСК, что намного выше, чем у МСК дериватов костного мозга. Группой Мепд теломеразная активность не изучалась.

МенСК, выделенные группой Patel, имели сходные характеристики с СК человеческого эндометрия по ряду показателей: экспрессии *c-kit* (*CD117*) (Conti C.J. et al., 1984), по экспрессии *Oct-4* (Matthai C. et al., 2006), по клональному размножению (Gargett C.E., 2007), а также с СК эндометрия мышей по *c-kit* (*CD117*) и *Oct-4* (Chambers I. et al., 2003). Исходя из этого, авторы придерживаются версии о происхождении МенСК из СК эн-

дометрия. Наличие эмбриональных маркеров SSEA-4 и Oct-4 объясняет высокую скорости размножения этих клеток.

Р.А. Мусина и соавт. (2008) отнесли выделенные МенСК по экспрессируемым маркерам, потенциалу дифференциации и морфологическим признакам к МСК, отметив при этом в качестве особенных признаков высокую клоногенную активность и низкую способность к дифференцировке в адипоциты.

A. Umezava и H. Makino (2008) на основании собственных исследований относят менструальную кровь к источникам получения МСК.

Несмотря на относительно недавнюю историю обнаружения МенСК, уже появились попытки изучения их практического использования.

Так, Cui et al. (2007) в той же публикации, которая открыла тему изучения менструальной крови как источника СК, исследовали предполагаемые эндометриальные прогениторы, полученные из образцов эндометриальной ткани, на предмет восполнения мышечной дегенерации у мышей с mdx-моделью миопатии Дюшенна. По замыслу авторов, имплантированные клетки должны были предоставлять человеческий дистрофин в дегенеративные мышцы иммунодефицитных *mdx*-мышей. Авторы изучили извлечённые из менструальной крови клетки, чтобы установить, могут ли первично культивированные нетрансформированные клетки также восполнить дистрофичные мышцы. *In vivo* перенос извлечённых из менструальной крови клеток в дистрофичные мышцы иммунодефицитных mdx-мышей восстанавливал экспрессию дистрофина сарколеммой. Имплантируемые клетки были помечены *enhanced-green*-флуоресцентным белком и раздельное состояние человеческих и мышиных ядер заставляло предположить, что человеческий дистрофин экспрессируется благодаря слиянию миоцитов хозяина и имплантированных клеток. Анализ in vitro показал, что эндометриальные прогениторные клетки и клетки, извлечённые из менструальной крови, могут эффективно трансдифференцировать в миобласты/миоциты, сливаясь с мышиными миобластами С2С12 при совместном культивировании in vitro и начинать экспрессировать дистрофин после слияния. На основании проведённого эксперимента авторы заключают, что эндометриальные прогениторные клетки и 34

дериваты менструальной крови могут переносить дистрофин в дистрофичные миоциты через слияние и транс дифференциацию *in vitro* и *in vivo*.

Тоуоda et al. (2007) также обратили внимание на миогенный потенциал клеток, извлечённых из менструальной крови, отметив её высокую репликативную активность и способность трансдифференцировать в миоциты с неожиданно высокой частотой. Это свойство МенСК позволяет спасать дистрофичные миоциты у мышей с *mdx*-моделью миопатии Дюшенна. Мигрhy et al. (2008) считают аллогенные МенСК «лекарст-

Мигрhy et al. (2008) считают аллогенные МенСК «лекарством с полки» для лечения критической ишемии нижних конечностей, опираясь на следующие свойства этих клеток: 1) высокий уровень продукции ростовых факторов и металлопротеаз 2) способность ингибировать воспалительный ответ и отсутствие иммуногенности 3) способность к размножению в большом количестве без утраты способности к дифференциации и нарушения кариотипа.

Ніда et al. (2008) обнаружили, что МенСК после соответствующей индукции начинают спонтанно делиться, демонстрируя кардиомиоцит-специфичное действие. Кардиальные тропонин-1-позитивные кардиомиоциты образуются *in vitro* в 27–32 % случаев. МенСК пролиферируют в среднем 28 поколений без влияния на кардиомиогенную трансдифференцировочную способность, и экспрессируют м-РНК из *GATA*-4 перед кардиомиогенной индукцией. Авторы предполагают, что большая часть кардиомиогенных клеток МенСК происходит из отслоившихся маточных эндометриальных желёз, так как МСК, полученные из моноклональных эндометриальных желёз в 76–97 % случаев трансдифференцируют в кардиальные клетки *in vitro*. МенСК были позитивны по *CD29*, *CD105* и негативны по *CD34*, *CD45*. Трансплантированные МенСК значительно улучшали нарушенную функцию сердца, уменьшали площадь инфаркта миокарда на модели у бестимусных крыс, ткань из кардиомиоцитов МенСК наблюдалась в зоне инфаркта миокарда *in vivo*. Авторы делают вывод о МенСК как о новом, мощном и доступном источнике для кардиальной клеточной терапии.

Нап et al. (2009) изучали способность неманипулированных МенСК изменять рост глиомы, с использованием агрессивной *C6/LacZ7* (*C6*) модели у СД-крыс. В основе идеи эксперимента

были положены результаты предыдущих исследований на животных, которые показали, что избирательный тропизм МСК к глиоме может быть использован в качестве средства селективной доставки цитотоксических средств. Эндометриальные регенеративные клетки являются популяцией клеток мезенхимального типа, которые обладают способностью к плюрипотентной дифференциации и характеризуется уникальными поверхностными маркерами и продукцией факторов роста. Эндометриальные регенеративные клетки вводили внутривенно, или внутрь опухоли. В результате показано значительное ингибирование глиомы: уменьшение объёма на 49 % после внутривенного введения (p < 0.05), и около 46 % после введения внутрь опухоли (p < 0.05). Редукция опухоли была связана с ингибированием ангиогенеза и сокращением числа CD133 позитивных клеток в инкраниальной опухоли. Несмотря на ангиогенный потенциал МенСК в модели ишемии задней конечности, эти данные подтверждают парадоксальную способность МенСК ингибировать опухоли. Авторы считают необходимым провести дополнительные исследования для определения качественных различий между физиологическим ангиогенезом, который, как представляется, поддерживается МенСК, и ангиогенезом опухоли, который, как оказалось, ингибируется МенСК.

держивается МенСК, и ангиогенезом опухоли, который, как оказалось, ингибируется МенСК.

Наконец Zhong et al. (2009) описали 4 случая использования МенСК внутривенно и интратекально у пациентов с рассеянным склерозом. Донорами менструальной крови послужили здоровые, некурящие женщины-добровольцы 18–30 лет. Исследование проводилось в рамках начальной стадии изучения безопасности препарата. Исследование продолжалось более года, за это время не было отмечено иммунологических реакций и побочных эффектов связанных с лечением. Эти предварительные данные говорят о возможности клинического использования МенСК и являются основанием для дальнейшего изучения этого нового типа СК.

При анализе опубликованных материалов нам удалось выделить способы получения эндометриальных клеток. Так, группа австрийских учёных по руководством К.Е. Schwab получала клетки эндометрия после гистерэктомии у женщин в возрасте от 31 до 52 лет. Операцию выполняли в пролиферативной фазе эндометрия, 5 мм слой эндометрия впоследствии собирался в среду, содержащую раствор Дульбеко, набор антимикотических 36

антибиотиков, ксеногенную сыворотку. Выделение клеток проходило с использованием коллагеназы, механического расщеп-

ходило с использованием коллагеназы, механического расщепления и применением магнитного сортинга.

L. Lynch и его коллеги из Университетского госпиталя в Дублине получали клеточный материал с помощью кюретажа при выскабливании матки и помещением клеточного материала в среду Хенкса с антибиотиками и ксеногенной сывороткой. В лаборатории материал отмывался от резидуальной крови и размещался в раствор с энзимами на 20 минут при температуре 37°C. В дальнейшем материал пропускали через марлевый фильтр и повторно отмывали, причём удалось добиться получения 1 мун клетого в мин ния 1 млн клеток в мл

ния 1 млн клеток в мл.

Японские исследователи из Университета Фукуока под руководством К. Като также получали материал из тканей матки после выполненной гистерэктомии у женщин в возрасте 37–49 лет. Клеточная суспензия была получена после механической и энзимной обработки тканей. В дальнейшем ею пропускали через марлевый фильтр и культивировали.

В России группа учёных под руководством Р.А. Мусиной из НЦ акушерства, гинекологии и перинатологии РАМН, получила эндометриальные клетки инвазивным путём с помощью биопсии тканей матки. В дальнейшем выполнялись работы по

культивированию клеток.

культивированию клеток.

По сообщениям R. Dimitrov из института биологии и иммунологии репродукции Болгарской Академии наук совместно с коллегами получены эндометриальные ткани после гистерэктомий у женщин в возрасте 32–52 года, выполненных по поводу аденомиоза матки, во время пролиферативной и секреторной фазы. Образцы помещались в ксеногенную сыворотку с антибиотиками и доставлялись в лабораторию, где эндометрий бережно отделялся от миометрия и разделялся механическим путём на небольшие фрагменты, которые помещались в раствор коллагеназы и выдерживался при 37°С в течение 1 часа. В дальнейшем, после фильтрации и центрифугирования, начинали культуральные работы.

С. Маtthai et al. получали клеточный материал из тканей матки после гистерэктомий, выполненных у женщин в возрасте 29–51 год, в независимости от дня менструального цикла.

29-51 год, в независимости от дня менструального цикла.

В своих работах S. Куо и коллеги из Университета в Кана-

В своих работах S. Куо и коллеги из Университета в Каназаве (Япония), получали эндометриальные ткани у женщин в возрасте 42–52 лет также после экстирпаций матки по причине миоматозного поражения. Операция выполнялась в поздний период менструального цикла, ткани помещались в среду Дульбеко с коллагеназой и диоксирибонуклеазой.

Х. Мепд из института биокоммуникационных исследований (Wichita, USA) собирал у здоровых женщин во время менструального цикла эндометриальные клетки, используя урологические колпачки. Содержимое колпачка переливалось в пробирки объемом 5 мл, содержащие антибиотики, раствор фосфатного буфера и ЭДТА. В дальнейшем клетки разделялись с помощью градиента Фиколла, затем культуральные работы выполнялись на чашках Петри, содержащих среду ДМЕМ, антибиотики, ксеногенную сыворотку. ногенную сыворотку.

ногенную сыворотку. Подобную методику получения эндометриальных клеток описал и Z. Zhong из госпиталя в Changsha (Китай), у молодых здоровых женщин в возрасте 18–30 лет в условиях стационара. Специально разработанный стерильный колпачок вводился во влагалище и оставался там в течение 30–60 минут. После этого содержимое колпачка переливалось в специальный собирающий контейнер, который перемещался в стерильное помещение, где выполнялись работы по очистке и выделению клеток.

В своих исследованиях авторы отмечали, что существует определённая взаимосвязь между качеством, жизнеспособностью, активностью клеток фазой менструального цикла и возрастом женщины.

2.7. Кластеры дифференцировки

Клиницисту приходиться сталкиваться в практике с характеристикой клеток, поэтому целесообразно суммировать маркеры, по которым характеризуются клетки. На поверхности клетки имеются определённые белковые молекулы, которые позволяют оценить принадлежность клетки к тому или иному виду.

Маркер	Значимость				
CD1a	Рецептор антигенов на лимфоцитах, клетках Лангенгарса				
CD2	Рецептор на Т-клетках, натуральных киллерах, тимофитах				
CD4	Маркер Т-хелперов				
CD6	Рецептор для активации Т-клеток				
CD8	Маркер Т-клеток				
CD9	Маркер МСК, ассоциированный с ангиогенезом (LiL.)				
CD10	Маркер предшественников Т- и В-лимфоцитов				
CD11	Маркер лейкоцитов, принадлежит к молекулам адгезии,				
	представитель семейства интегринов				
CD14	Маркер моноцитов				
CD15	Маркер эмбриональных стволовых клеток				
(SSEA-4)					
CD17	Маркер нейтрофилов				
CD18	β2-интегринучаствуют в адгезии лейкоцитов к эндотелик				
	или другим клеткам иммунной системы				
CD21	Рецептор вируса Эпштейн-Барра				
CD29	В1-интегринмолекула адгезии на мезенхимальных и ство-				
	ловых клетках печени (ChoN.H.)				
CD31	Является маркером ангиогенеза, экспрессируется на лей-				
	коцитах и эпителиальных клетках				
CD33	Антиген, свойственный клеткам миелоидного ряда				
CD34	Маркер гемопоэтических стволовых клеток				
CD38	Маркер дифференцирующихся гемопоэтических СК				
CD41a	Рецептор для фибриногена обнаруженный на МСК и тромбоцитах				
CD44	Рецептор гиалуроновой кислот обнаруженный на тканевых				
	стволовых клетках и МСК				
CD45	Маркер лейкоцитов				
CD49	маркер МСК				
CD54	Маркер моноцитов и эндотелия				
CD56	Маркер нервных клеток,				
CD57	Маркер натуральных киллеров				
CD59	Белок ингибирующий комплемент обнаруживается на				
	MCK(Jabbour H.N.)и стволовых гемопоэтических клетках SP-				
	популяции костного мозга (Prianishnikov V.A.)				
CD65	Рецептор миелоидных линий клеток				
CD69	Сигнальная молекула гемопоэтических клеток				
CD70	Маркер активированных Т- и В-клеток				
CD71	Маркер активированных лейкоцитов, обнаруживается на				
	большинстве делящихся клеток				

CD73	Экто-5'-нуклеотидаза, вовлечённая в миграцию МСК				
CD79	Маркер В-клеток				
CD81	Маркер мезенхимальных стволовых клеток				
CD83	Маркер дендритных клеток				
CD90	Маркер Т-клеток, гемопоэтических и МСК				
CD93	Маркер эндотелиальных клеток				
CD105	Маркер МСК				
CD106	Рецептор VCAM-1 на МСК и эндотелиоцитах				
CD111	Маркер нейрональных стволовых клеток и нейроэпителиальных клеток				
CD112	Молекула адгезии между эпителиальными и эндотелиальными клетками				
CD117	Маркер гемопоэтических стволовых/прогениторных кле-				
(c-KIT)	ток				
CD133	Гемопоэтический/ангиобластный маркер				
CD139	Маркер кроветворных клеток				
CD144	Маркер прогениторов эндотелиальных клеток				
CD145	Маркер эндотелиальных и стромальных клеток				
CD150	Маркер активированных лимфоцитов				
CD166	Молекула клеточной адгезии, маркер МСК				
CD175	Маркер стволовых клеток				
CD235	Гликофорин А				
Nectin-1	Маркер НСК				
(CD111)					
Nectin-2	Молекула адгезии между эпителиальными и эндотелиаль-				
(CD112)	ными клетками				
DAF	Маркер гемопоэтических клеток				
(CD55)					
ICAM	Маркер моноцитов и эндотелия				
(CD54)					
L-селектин	F 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1				
	к эндотелию в начальной фазе воспаления, а также участ-				
	вует в хоуминге лимфоцитов				
Oct-4	Маркер эмбриональных стволовых клеток				
STRO-1	Маркер мезенхимальных стволовых клеток				
Nanog	Маркер эмбриональных стволовых клеток				

2.8. Криоконсервация

Криоконсервация — процесс замораживания и хранения биологических материалов и, в частности, клеток. В настоящее время, собранные и полученные клетки до момента использования в исследовательских целях сохраняются в жидком азоте. Сохранение при низкой температуре практически полностью блокирует все метаболические процессы в клетках (Makino S. et al., 1991).

Перед криоконсервацией клеток добавляют криоконсерванты для протекции от низких температур. Концентрация и соотношение с клетками криопротектора являются важными факторами, отвечающими за жизнеспособность клеток. Наиболее известный в настоящее время и более всего применимый криопротектор является диметилсульфоксид (ДМСО), который используется с 60-х годов прошлого столетия (Wells J.R. et al., 1979; Sputtek A., Köber C., 1991; Rowley S.D., 1992). Первые сообщения о лабораторных исследованиях ДМСО как криопротектора были выполнены на человеческих эритроцитах и сперматозоидах крупного рогатого скота (Lovelock J.E., Bishop M.W., 1959). ДМСО относительно свободно проникает внутрь клетки через мембраны и предотвращает формирование кристаллов льда внутри клетки, а также разрывы мембран во время замораживания (Branch D.R., 1994). В доступной литературе описаны различные комбинации использования различных веществ с ДМСО (Donaldson A., 1996; Gorlin J., 1996; Sputtek A., 1997; Halle P., 2001). Введение большого количества ДМСО в организм реципиента совместно с клетками часто приводит к различным токсическим реакциям, таким как тошнота, рвота, гипотензия, транзиторная гипертензия, нарушение ритма и более тяжелые, как анафилаксия и острая почечная недостаточность (Keung Y.K. et al., 1994; Martino M. et al., 1996; Zambelli A. et al., 1998). Heraтивные эффекты от ДМСО зависят от количества погибших клеток, которые также могут вызывать побочные явления в виде лихорадки или схваткообразных болей в животе (Zambelli A. et al., 1998), поэтому у больных необходимо проводить превентивные мероприятия в виде введения антигистаминных или гормональных препаратов (Hermández-Navarro F. et al., 1995). У здоровых людей после введения значительного количество ДМСО могут возникать такие симптомы, как головная боль и различного рода реакции желудочного-кишечного тракта, не только от самого ДМСО, но и от его метаболита — диметилсульфида, который является более токсичным соединением и, в отличие от ДМСО, который выводится почками, в течение 2 суток продолжает выделяться через кожу, легкие и почки. Таким образом, попадание значительного количества ДМСО в организм может вызывать проблемы для здоровья в течение нескольких дней.

Замораживание клеток при низких температурах сохраняет их метаболические механизмы, но иногда приводит к повреждению клеточных мембран, потому что быстрое охлаждение в физиологическом растворе приводит к формированию кристаллов льда внутри клеток. Кристаллы льда разрушают мембранные барьеры клетки и клеточных органелл (Mazur P., 1977; Gorlin J., 1996). Поэтому добавление различного рода криопротекторов просто необходимо. Раствор ДМСО – прозрачная, бесцветная жидкость, имеющая сильную связывающую способность для воды (Brayton C.F., 1997), поэтому он очень хорошо растворим в воде и спокойно проходит через клеточные мембраны, что создает прекрасные условия для поддержания постоянного осмотического градиента как внутри, так и снаружи клетки, предохраняя от формирования кристаллов льда. К сожалению, выполняемые действия по криоконсервации для некоторых клеток являются губительными (Rowley S.D., 1992). Техника криконсервации для СК и эритроцитов различна (Mazur P., 1977), чрезвычайно плохо криоконсервируются гранулоциты (Rowley S.D., 1992). В настоящее время поиск новых криопротекторов продолжается в основном в двух основных направлениях: 1) применение низкомолекулярных, хорошо проникающих в клетки соединений (в качестве таких соединений успешно апробированы димексид, диметилацетамид, 1,2-пропандиол и др.); 2) применение высокомолекулярных соединений, обеспечивающих криозащиту без проникновения в клетки.

Преимущества второго направления очевидны, однако существует много нерешенных проблем. В определенной мере обнадеживающие результаты получены при использовании в качестве криопротекторов *поливинилпирролидона* с молекулярной

массой 12000—25000Д, *полиэтиленоксида* — с молекулярной массой 1500 и 4000Д (Иванов Д.В., 2000) и *оксиэтилкрахмала*.

Исторически сложилось так, что первое направление значительно опередило в своем развитии второе. Более того, проникновение криопротектора в клетки ранее считали необходимым условием их защиты. Действительно, присутствие криопротекторов внутри клеток снижает интенсивность процессов вымораживания воды из растворов, концентрирования внутриклеточных солей и величину возникающих на мембране градиентов концентраций. Тем не менее, после процедуры криконсервирования внутриклеточный криопротектор может выступать в роли повреждающего фактора, если не приняты необходимые меры по его удалению из клеток до этапа их ресуспендирования в изотонической среде (Шахов В.П. и соавт., 2004).

Процедура удаления криопротектора из клеток (отмывание) требует соблюдения основного условия: осмотическое давление отмывающих растворов должно эффективно предотвращать набухание клеток до критических пределов, при которых возможны нарушения ионного баланса. Несмотря на трудоемкость процедуры отмывания, в настоящее время накоплен достаточно большой опыт длительного хранения замороженных тканей (в том числе – клеток крови) с последующим клиническим применением.

С нашей точки зрения наиболее оптимальной является среда для криоконсервирования, когда используется заменитель эмбриональной телячьей сыворотки и криопротектор — ДМСО в соотношении 9:1. Криопробирки с суспензией клеток в среде для криоконсервирования постепенно охлаждают со скоростью $\sim 1^{0}$ С в минуту до $\sim 70^{0}$ С и через 24 часа переносят на хранение в жидкий азот (- $\sim 196^{0}$ С). В этих условиях клетки могут храниться десятилетиями. В последующие годы они могут быть извлечены из криогенного хранилища, разморожены и использованы.

2.9. Реконсервация

Этап приготовления клеточного материала для последующих работ после длительного хранения в условиях низких температур — реконсервация — не менее важен, чем процесс крикон-

сервации. При заборе криопробирок из жидкого азота необходимо соблюдать технику безопасности (использовать защитные очки или маску, специальные перчатки и т.п.), так как при нарушении режима размораживания возможен взрыв криопробирок. После извлечения из сосуда Дьюара или криохранилища быстро помещают криопробирку с клетками в водяную баню (37–38 $^{\circ}$ C). Оставляют на несколько минут до оттаивания внутреннего содержимого. Проверку полного оттаивания внутреннего содержимого осуществляют плавным переворачиванием криопробирки до появления однородной клеточной массы без крупных конгломератов. Дальнейшие манипуляции проводят в стерильных условиях для снижения риска контаминации клеточного материала. Самый оптимальный вариант — это работа в ламинарных шкафах. После извлечения клеточного материала из криопробирок его откручивают в центрифугах при режимах g = 600-1000cm 2 /c в течении 7–10 минут для удаления супернатанта. Повторяют процедуру отмывания минимум 2 раза. После подготовки клеточного материала проверяют его жизнеспособность. В настоящее время появились автоматические счетчики, которые позволяют давать результаты в виде графиков и картинок, на которых отражаются жизнеспособность клеток, их количество, размеры и многие другие параметры.

2.10. Фетальные клетки

Осуществлено изучение свойств и источников для получения фетальных клеток, под которыми понимаются клетки, которые получаются с 9 недели развития человека. В последние 5 лет отмечен очевидный прогресс в описании базисных особенностей ЭСК и разнообразных типов взрослых СК, включая методы репрограммирования, определения сроков жизни СК и концепцию «ниш» нахождения (Klimanskaya I. et al., 2008). На фетальные клетки стали обращать больше внимания, что связано с получением результатов по применению взрослых СК. Их терапевтический потенциал был всегда высок, торможение развития в данной области связано с морально-этическими вопросами и отношением церкви. Фетальные клетки могут быть получены непосредственно из фетуса или же из поддерживаю-44

щих структур фетуса (Hemberger M. et al., 2008). К ним относятся амниотическая жидкость, Вартонов студень, амниотическая мембрана, плацента, а также пуповинная кровь. Практически все эти источники после рождения ребенка утилизируются. Сейчас активно начинает использоваться пуповинная кровь. Все эти ткани содержат огромное количество клеток, причем легко получаемых для исследований особенностей популяций СК и, что самое главное, без каких либо морально-этических проблем по сравнению с ЭСК. Эти относительно новые источники дают также возможность проследить судьбу различных типов фетальных клеток. Особенно это может быть использовано для описания и прослеживания онтогенеза, т.е. развития определенного типа СК. Все выполненные до настоящего времени исследования показывают, что СК, полученные из фетальных источников, имеют схожие свойства с ЭСК по экспрессированию определенных маркеров (Guillot P.V. et al., 2007). Они обладают способностью к самообновлению, в то время как их спектр дифференцировочного потенциала, несмотря на место их локализации – in vivo или in vitro, размещается посередине между плюрипотентными ЭСК и мультипотентными взрослыми СК. Рассмотрим более подробно каждый из источников.

2.10.1. Амниотическая жидкость

В рутинной медицинской практике амниотическая жидкость получается с помощью амниоцентеза для диагностических целей, однако совсем недавно появились работы, в которых имеются важные предположения о потенциале СК, полученных из амниотической жидкости и сделан акцент на возможность получения СК из альтернативного источника (Prusa A.R. et al., 2003, 2004; Tsai M.S. et al., 2004, 2006; Zhao P. et al., 2005; Bossolasco P. et al., 2006; De Coppi P. et al., 2007; Roubelakis M.G. et al., 2007; Kim J. et al., 2007; Perin L. et al., 2008; Kolambkar Y.M. et al., 2007; Kunisaki S.M. et al., 2007). Естественно, что популяция клеток в амниотической жидкости гетерогенна, в её состав входят клетки из всех трех зародышевых листков, и она содержит множество частично дифференцированных прогениторных клеток. Большинство из этих клеток имеют эпителиальное проис-

хождение, т.е происходят или из развивающегося фетуса или же из внутренней поверхности амниотической мембраны. Кстати, в отношении клеток, полученных из амниотической оболочки, идут оживленные дискуссии в отношении того, чтобы называть их «стволовыми клетками амниотической оболочки». Клетки амниотической жидкости на ранних этапах гестации экспрессируют большое количество эндодермальных и мезодермальных маркеров, по сравнению с более поздними сроками гестации, в тоже самое время различия по эктодермальным маркерам не отмечено вообще (Perin L. et al., 2008). Введение в практику двухстадийных культуральных протоколов позволило не только изолировать, но и клонально нарастить мультипотентные мезенхимальные СК (ММСК) из амниотической жидкости второго триместра беременности и получить их фенотипические характеристики (Tsai M.S. et al., 2004). Эти ММСК из амниотической жидкости экспрессировали маркеры типичные для мезенхимальных клеток, в частности CD29, CD90, CD166, CD73, CD105, CD49e (Bossolasco P. et al., 2006; De Coppi P. et al., 2007; Roubelakis M.G. et al., 2007; Kolambkar Y.M. et al., 2007). Они были позитивны для интегрина VLA5, эндотелиального маркера CD44 (HCAM-1 antigen), CD58 и, самое важное, были негативны на гемопоэтические маркеры CD45, CD34 и CD14 (Tsai M.S. et al., 2006; Roubelakis M.G. et al., 2007), а также негативны для мио-генных маркеров (Bossolasco P. et al., 2006). Была также отмечена важная особенность клеток из амниотической жидкости: после клональных методов культивирования они начинали экспрессировать маркеры нейральных клеток (Prusa A.R. et al., 2004; Tsai M.S. et al., 2006). Проведённые исследования независимыми группами исследователей доказали, что эти клетки могут проявлять характеристики мультипотентных СК благодаря обнаруженным у них маркеров СК таких как Oct-4, Nanog, SSEA-4 (De Coppi P. et al., 2007; Roubelakis M.G. et al., 2007; Kim J. et al., 2007). Устойчивая экспрессия маркера Oct-4 в культуре МСК из амниотической жидкости по данным одних авторов (Roubelakis M.G. et al., 2007) составила 30 пассажей, других исследователей (Кіт J. et al., 2007) только до 19 пассажа. И в первом, и во втором случае – это большое количество пассажей для «разгона» культуры. Более того эти клетки после методов кло-46

нального культивирования поддерживались в недифференцированном состоянии и сохраняли плюрипотентность, клонногенность и, особенно важно, геномную стабильность. Сохранение геномной стабильности говорит об отсутствии патологически изменённых популяций клеток, или, в клинической практике отсутствие туморогенной трансформации введённого материала. Проверка геномной стабильности проводилась с помощью анализа кариотипа, и по данным клеткам одной группой учёных проверялась более чем на 250 популяциях (De Coppi P. et al., 2007; Perin L. et al., 2008), другой группой учёных (Roubelakis M.G. et аl., 2007) проверялись более чем 20 пассажей. Проведён успешный опыт поддержания культуры мезенхимальных клеток из амниотической жидкости в течении 8 месяцев (Kim J. et al., 2007)! При этом сохранялся стабильный кариотип и высокая пролиферативная активность. Пролиферативная активность по одним данным составила 36 часов (De Coppi P. et al., 2007), когда количество клеток увеличивается в 2 раза, по данным других исследователей (Roubelakis M.G. et al., 2007) составила 18 часов. Систематическое изучение популяции мезенхимальных клеток из амниотической жидкости показало, что данные клетки очень быстро пролиферируют. Наблюдалось более чем 9-ти кратное логарифмическое увеличение со средним периодом 32,9 дня независимо от гестационного срока (Kunisaki S.M. et al., 2007). Этот пример наглядно говорит о том, что для получения 100×10^6 клеток необходимо всего лишь 5 мл амниотической жидкости (Kunisaki S.M. et al., 2007). Другие работы зафиксировали достоверную корреляцию между получением МСК и плотностью посева при культивировании при низкой плотности (400 клеток на см²). В результате увеличение дублирования популяции происходило в 21 раз (Sessarego N. et al., 2008). Количество МСК из амниотической жидкости оценивается от 0,9 до 1,5%, в то время, как приблизительно 2,7х10⁵ МСК из амниотической жидкости может быть получено при начале культивирования из каждого образца. Наконец, клонально увеличенные МСК из амниотической жидкости показывают широкий спектр дифференцировочного потенциала, давая линии таких клеток, как адипоциты, хондроциты, остеоциты, гепатоциты, нейральные клетки и кардиомиоциты (Tsai M.S. et al., 2006; De Coppi P. et al., 2007).

Достоверно доказано присутствие плюрипотентных клеток в амниотической жидкости, благодаря использованию позитивной иммуноселекции с применением поверхностного антигена CD117 (c-kit рецептор) и тирозинкиназного фактора специфичного для СК, которые первично присутствуют на ЭСК и первичных зародышевых клетках (De Coppi P. et al., 2007). Прямое доказательство плюрипотентности этой *CD117*⁺ популяции СК было получено впервые с помощью изящного метода, тестирующего клональные линии, и подтверждённого потом с помощью мечения ретровирусами. Установлена способность клеток іп vivo дифференцироваться в функциональные клетки всех трёх зародышевых ростков (De Coppi P. et al., 2007). Эти *c-kit*⁺ клетки могут представлять те же самые плюрипотентные СК, которые были получены из культуры МСК из одной амниотической клетки и описаны ранее (Tsai M.S. et al., 2006). Важно отметить, что ни одна из описанных выше клеточных линий после результатов тестирования не привела к тератомам, что крайне важно для дальнейшего безопасного использования СК, полученных из амниотической жидости, в клинических целях. Хотя метод оценки туморогенности в данных исследованиях выполнялся при жёстких условиях и адекватном контроле, должно быть отмечено, что отсутствие формирования тератомы просто говорит о низкой скорости роста и незначительной степени спонтанной пролиферативной способности и дифференцировки этих СК. Главные шаги вперёд для углублённого понимания функциональных клеточных взаимодействий фетальных СК по сравнению с взрослыми СК были сделаны совсем недавно как на *транскриптонном* (Tsai M.S. et al., 2006), так и на *протеомном* уровнях (Roubelakis M.G. et al., 2007). Эти работы показали не только наличие в ядре клеток целого ряда белков и генов транскрипции, которые присутствуют в МСК из разнообразных источников, но также и зафиксировали уникальные особенности, опосредованные транскриптами и белками, связанными с пролиферацией и примитивным фенотипированием СК как в амниотической жидкости, так и в амниотической оболочке, пуповинной крови и костном мозге. Остаётся проверить предположение: действительно ли это протеины и какова их значимость в придании индивидуальных особенностей различным типам фетальных клеток.

Применение *in vivo* МСК из амниотической жидкости сейчас только начинается. Это несмотря на то, что данные клетки проявляют характеристики кардиомиоцитов (Zhao P. et al., 2005). Использование их на моделях ишемии не привело к дифференцировке в кардиомиоциты, однако резко усилило процессы неоваскуляризации (Sartore S. et al., 2005). Эти данные доказывают, что данные клетки требуют репрограммирования до введения (Chiavegato A. et al., 2007). Похожие предварительные результаты были достигнуты при восстановлении повреждённого седалищного нерва (Pan H.C. et al., 2006), восстановлении частичного или полного циркулярного дефекта трахеи (Kunisaki S.M. et al., 2007), создании клапанов сердца (Schmidt D. et al., 2007), интеграции в повреждённую почку и выживание в ткани почки (Perin L. et al., 2008), или, через паракринный эффект, отображение комбинированного эффекта на посттравматическое ремоделирование и гладкомышечную регенерацию мочевого пузыря (De Coppi P. et al., 2007).

2.10.2. Вартонов студень

Вартонов студень, или слизистая соединительная ткань пупочного канатика, содержит в себе СК, которые называются некоторыми авторами СК матрикса пуповины (Weiss M.L. et al., 2006), или периваскулярные клетки пуповины канатика (Sarugaser R. et al., 2005), или стромальные клетки (Karahuseyinoglou S. et al., 2007). Данные клетки в последние годы были подробно исследованы и получили описательные характеристики (Mitchell K.E. et al., 2003; Wang H.S. et al., 2004; Sarugaser R. et al., 2005; Weiss M.L. et al., 2006; Karahuseyinoglou S. et al., 2007). Эти клетки представляют собой более насыщенный вид по сравнению с MCK, полученными из костного мозга, или крови пупочного канатика. В частности, эти стромальные клетки были изолированы из слизистой соединительной ткани, которая называется Вартонов студень, окружающей две артерии и одну вену пупочного канатика. Они являются миофибробластными клетками различного пространственного расположения, причём большинство пролиферирующих клеток располагается возле амниотической поверхности, в то время как фибробластоидные

клетки (по-другому – *периваскулярные СК*), располагаются ближе к трём сосудам. Систематическое изучение позволило охарактеризовать различные стадии их роста in vivo в течение 10-ти месячного периода и выделить некоторые исключительные особенности *стромальных клеток* пуповины (Karahuseyinoglou S. et al., 2007). Из одного образца крови пуповинного канатика может быть получено около $3,6x10^6$ жизнеспособных *стромальных клеток*, в то время, как общее их количество к 7 месяцам составляет приблизительно 11,5х10⁸ клеток, показывающих стабильную теломеразную активность до 6 пассажа (Karahuseyinoglou S. et al., 2007). В других работах зафиксировано получение около $17x10^3$ клеток на 1 см длины пуповины, разброс составляет от $10x10^3$ до $50x10^3$ клеток на 1 см (Weiss M.L. et al., 2006). Обнаружено также, что морфологически *стромаль*ные клетки Вартонова студня состоят из двух типов популяций клеток. Разделение основано на их особенностях в экспрессии виментиновых и цитокератиновых филаментов, разделяя похожие способности дифференцироваться в несколько линий клеток, исключая нейрональные клетки (Karahuseyinoglou S. et al., 2007). Изолированные *стромальные клетки* (катапизеутновной S. et al., 2007). Изолированные *стромальные клетки* пуповины при культивировании в условиях исключающих остеогенное направление – дают популяцию МСК с гомогенной фибробластной морфологией и высокой степенью пролиферативной активности и дифференцировки в костные узелки. Определено, что данные клетки содержат легко нарастающую субпопуляцию клеток, которые не экспрессируют ни 1, ни 2 класс комплексов гистосовместимости, а это - важная особенность для дальнейшего клинического применения, так как отсутствие комплексов гистосовместимости обеспечивает полное приживление клеточного материала. Более того, около 20% периваскулярных клеток пуповины вообще не экспрессируют антигенов комплексов гистосовместимости. Причём данная популяция способна увеличиваться до 95% после пассажей и криоконсервации (Sarugaser R. et al., 2005). Однако никаких данных in vivo по этим свойствам не получено, или же они действительно могут поддерживать этот фенотип вследствие дифференцировки. МСК, полученные из Вартонова студня не экспрессируют маркеры гемопоэтических клеток, зато отлично экспрессируют типичные маркеры,

свойственные мезенхимальным клеткам, а также могут дифференцироваться в адипоциты, остеогенные и хондрогенные клетки, кардиомиоциты (Wang H.S. et al., 2004), нейроны или глиальные клетки (Mitchell K.E. et al., 2003), и даже, в допаминэргические нейроны, которые могут частично корректировать нарушение обмена амфетаминов на крысиной модели болезни Паркинсона (Fu Y.S. et al., 2006). Более того, как показали последние исследования у человека (Weiss M.L. et al., 2006) и свиньи (Carlin R. et al., 2006), стромальные клетки Вартонова студня экспрессируют дополнительные ЭСК маркеры, такие как Oct-4, Sox-2, Rex-1, Nanog.

Были успешно оценены поведенческие эффекты человеческих *стромальных клеток* пуповины на крысиной модели болезни Паркинсона (Weiss M.L. et al., 2006). Важно заметить, что это исследование зафиксировало отсутствие туморогенных формирований в течение 12 недельного периода наблюдения. Однако, необходимо проводить дальнейшие исследования, подтверждающие безопасность этих клеток в более поздние сроки. Уже было несколько попыток оценки дифференцировки *in vivo стромальных клеток Вартонова студня* для клеточной терапии. В частности, была проведена успешная работа на мышах по регенерации мышц после тяжёлого повреждения мышечной ткани (Conconi M.T. et al., 2006).

2.10.3. Амниотическая оболочка

Совсем недавно выяснилось, что амниотическая оболочка, или просто — амнион, может представлять собой новый и альтернативный источник получения популяции фетальных СК. Особенность амниона в том, что он состоит из трёх слоёв клеток и после 8 дня развития в нем не существует сосудистой сети. Три слоя включают в себя: внутренний эпителиальный слой, который состоит из эпителиальных клеток и у них есть название амниотические эпителиальные клетки; промежуточной основной мембраны, которая вообще не имеет клеточных элементов и, наконец, наружный слой, который тесно соединён с хорионом и состоящий из мезенхимальными клеток, называющихся амниотическими мезенхимальными или мезенхимальными

стромальными клетками амниотической оболочки. Так как эти амниотические клетки часто называются СК из амниона, происходящие из эпибластных клеток, считается, что они могут отражать некоторые особенности СК в течение всего периода гестации и ассоциируются с клетками, которые экспрессируют незначительное количество *HLA*-антигена. Первичные эпителиальные клетки амниона содержат антигены главного комплекса гистосовместимости 1А и 2 класса, согласующиеся с низким риском тканевого отторжения. Однако, вследствие дифференцировки в клетки поджелудочной железы или в печени, но не в кардиогенном направлении, статистически значимый процент клеток начинает экспрессировать антигены класса 1А главного комплекса гистосовместимости, но не 2 класса (Ilancheran S. et al., 2007). Следовательно, необходимо проводить дополнительные исследования для лучшего понимания механизмов антигенной экспрессии до того момента как данные клетки попадут в клинику. Ĥедавно проведенные исследования амниона выявили среди эпителиальных клеток около 10% клеток, которые экспрессировали маркеры СК, в частности SSEA-4, Tral-60, Tral-80 (Miki T. et al., 2007), домен *POU*, *Nanog*, гены *SRY-box* (Ilancheran S. et al., 2007). Причём именно в эпителиальных, а не в мезенхимальных клетках амниона. Необходимо заметить, что клеточная гетерогенность в распределении маркеров СК в данном фетальном материале говорит о том, что популяция СК человеческого амниона представлена в разных местах во время развития и дифференцировки организма, т.е. она перемещается из одного участка в другой. У эпителиальных клеток амниона была обнаружена способность дифференцироваться во всех клетках трёх зародышевых листков (Miki T., Strom S.C., 2006). Эти особенности эпителиальных клеток можно связать с тем фактом, что они напрямую происходят из эпибласта и таким образом могут сохранять в себе пластичность прегаструляции ЭСК. Однако, важно отметить что эти СК амниона, в отличие от ЭСК, не образуют тератому in vivo, как минимум в течение 10 недель после введения (Ilancheran S. et al., 2007). Пластичность СК, полученных из амниона, была проверена на клональном уровне, где были зафиксированы способность к мультидифференцировке и многократному самообновлению популяции (Marcus A.J. et al.,

2008). Пролиферативная частота мезенхимальных клеток амниона составила приблизительно 300 кратное увеличение за 21 день, прибавка составляла 2,9х10⁶ клеток (Alviano F. et al., 2007). Необходимо отметить, что наружный слой амниона представляет собой богатый источник МСК со способностью этих клеток дифференцироваться в эндотелиальные клетки in vitro (Alviano F. et al., 2007), а кардиомиоциты и гепатоциты как in vitro, так и in vivo (Татадаwа T. et al., 2007). Другой важной особенностью мезенхимальных клеток амниона является их способность проявлять контактный и дозозависимый иммуномодуляторный эффект на мононуклеары в периферической крови (Wolbank S. et al., 2007). Эти свойства отражают общую способность МСК или стромальных клеток, полученных из разных источников, высвобождать оксид азота в ответ на появление провоспалительных цитокинов из активированных Т-клеток (Keating A., 2008). Эти новые разъяснения механизмов иммуномодулирующего эффекта МСК обеспечивают возможность действительно использовать эти мультипотентные СК в качестве альтернативного источника клеток для применения в тканевой инженерии, как аллогенный материал.

2.10.4. Плацента

Плацента представляет собой важнейший источник для получения СК с разнообразной потенцией. Развивается плацента из трофоэктодермы, состоящей из трофобластных компонентов, включающих цитотрофобласт и синцитотрофобласт. Чистая популяция СК из тканей человеческой плаценты (Hemberger M. et al., 2008) состоит из хориональных мезенхимальных стромальных клеток и хориональных трофобластных клеток. Обе популяции проявляют изменчивую пластичность (Parolini O. et al., 2008). Находиться в недифференцированном состоянии трофобластным СК удаётся благодаря воздействию транскрипционного гена Ets2 (Wen F. et al., 2007). Благодаря экспрессии специфических маркеров (FZD9 или CD349) мезенхимальными клетками плаценты, их легко селективно выделить (Battula V.L. et al., 2008). Недавно была выделена из материнской части (париетальная оболочка) популяция СК плаценты, равномерно

экспрессирующая маркеры плюрипотентности (SSEA-4, SSEA-1, Oct-4, Stro-1, Tra 1-81), наряду с мезенхимальными и гемопоэтическими маркерами (Strakova Z. et al., 2008). Мезенхимальные клетки, полученные из плаценты, более эффективны, чем МСК из костного мозга, в поддержке клеток, как фидерный слой и позволяют дольше размножаться человеческим ЭСК (Kim S.I. et al., 2007). Однако не обнаружено достоверных различий в количестве необходимых клеток и скорости роста между МСК из костного мозга и МСК из плаценты (Miao Z. et al., 2006). Характеристики СК, полученных из плаценты, такие же как и у МСК по иммуномодуляторным свойствам (Li C. et al., 2007; Jones B.J. et al., 2007; Li D. et al., 2007) с дополнительно индуцированной экспрессией плюрипотентных маркеров SSEA-4, Nanog 3, Oct-4 (Battula V.L. et al., 2007) и Rex-1 (Fukuchi Y. et al., 2004). Они также проявляют типично широкий спектр дифференцировочной способности МСК (Fukuchi Y. et al., 2004; In't Ânker P.S. et al., 2004; Portmann-Lanz C.B. et al., 2006; Battula V.L. et al., 2007; Parolini O. et al., 2008), включая дифференцировку в нейрональные и глиальные клетки in vitro (Yen B.L. et al., 2008), инсулинпозитивные клетки как in vivo, так и in vitro (Chang C.M. et al., 2007), гепатоциты (Chien C.C. et al., 2006) и даже создание клапанных структур сердца на биодеградируемом (Schmidt D. et al., 2006). Примечательно, что недавно было обнаружено свойство маркера плюрипотентности Oct-4 снижать свои эпигенетические способности через процессы метилирования в плаценте, что может быть важным в понимании патогенеза возникновения болезни трофобласта во время беременности (Zhang H.J. et al., 2008). Недавно было также обнаружена способность СК, полученных из плаценты, дифференцироваться в эндотелиальные клетки (Wu C.C. et al., 2008). Интересно отметить, что были обнаружены различия между эндотелиальными клетками полученными из артерий и вен плаценты (Lang I. et al., 2008). Фенотипические, генотипические и функциональные особенности, включая пластичность, тесно связаны с высокопластичным фенотипом венозных клеток, а не с более зрелым фенотипом артериальных клеток, что поддерживает теорию о роли эндотелиальных прогениторов, оставшихся в тканях во время эмбрионального развития, для их формирования (Lang I. 54

et al., 2008). По взаимодействию с другими типами СК клетки из плаценты проявляют более выраженные свойства по приживлению, чем, например, СК полученные из костного мозга, и все это благодаря более эффективному использованию VL-4 опосредованным связям (Brooke G. et al., 2008). Специфические производные из культивированных МСК плаценты обозначают как PLX-I, также имеют усиленное приживление по сравнению с ГСК (Prather W.R. et al., 2008). Циркулирующие фетальные фиброциты, которые обнаруживаются после первой открутки клеток из сосудов пуповины и плаценты, представляют собой важное хранилище для ключевых клеточных популяций плаценты (Kim J.S. et al., 2008). Более важный момент заключается в том, что мигрирующие фетальные фиброциты были обнаружены в изменённом виде в недоразвитой матке, что даёт возможность определить их роль в развитии этой патологии. Удалось выяснить вероятный механизм перемещения клеток между матерью и плодом, приводящий в результате к материнскому микрохимеризму, с помощью циркулирующих материнских мультипотентных МСК. С помощью *VEGF-A* и интегрин зависимый путь, они проникают через гемохориальную часть плаценты в плод, где и были обнаружены у фетуса (Chen C.P. et al., 2008). Более того, недавние экспериментальные исследования представили неопровержимые доказательства того, что ткани плаценты за жёлтым мешком и дорсальной и желточной аортой также являются подлинными и самостоятельными местами регенерации ГСК, развивающимися до стадии фетальной колонизации (Rhodes K.E. et al., 2008). Циркулирующие в плаценте $CD34^+$ гемопоэтические прогениторные клетки и $CD31^+$ и $CD133^+$ эндотелиальные клетки плаценты – окружают кровеносные сосуды плаценты и экспрессируют модулярный белок АСВД6. В настоящее время считается, что данный белок находится в гемангиогенных СК, которые являются предшественниками клеток крови и сосудов (Soupene E. et al., 2008). Не решённый на данный момент вопрос о происхождении раковых СК может быть решён с помощью модели хориокарциномы, которая является новообразованием из цитотрофобласта и синцитотрофобласта. Иммуногистохимические исследования выявили, что она компонуется в большей степени из синцитотрофобласта и интермедии трофобласта и совсем в малого процента клеток цитотрофобласта (Мао J.L. et al., 2007). Часть из небольшого процента клеток, которые экспрессируют ядерный β -катенин, представляют собой чисто раковые СК, которые дают две популяции малигнизирующих опухолей (Мао J.L. et al., 2007).

2.10.5. Пуповинная кровь

В течении последних 20 лет пуповинная кровь (ПК) преподносится как насыщенный источник гемопоэтических и прогениторных СК с установленным терапевтическим эффектом в лечении нарушенного гемопоэза (Broxmeyer H.F. et al., 2006). Данные методики лечения гематологических больных принесли неоспоримые доказательства успеха клеточных технологий. Около 1% мононуклеаров ПК экспрессирует *CD34*+ антиген, который является основным маркером ГСК. Способность *CD34*+ клеток к самообновлению и дифференцировке в несколько клеточных линий была неоднократно доказана как in vitro, так и in vivo, включая оценку репопуляции гемопоэтических клеток у иммунодефицитных мышей (Broxmeyer H.E., 2005). Репопулирующие клетки у мышей экспрессировали высокий уровень *CD34*+. Количество клеток с высоким уровнем экспрессии СD34+ в ПК намного выше по сравнению с материалом, полученным из костного мозга или периферической крови после мобилизации цитокинами. Эффект приживляемости у ГСК в место трансплантации опосредован через специфическую кратковременную репопуляцию (Mazurier F. et al., 2003). Хотя ГСК из ПК успешно увеличиваются в количестве до трансплантации, чтобы улучшить свою способность для хоуминга и приживляемости, они начинают проявлять свойства утраты долговременного приживления (McNiece I.K. et al., 2002). Эти результаты косвенно подтверждают, что помимо цитокиновых эффектов, необходимы клеточные и молекулярные факторы для хорошего приживления и хоуминга. Поэтому кажется правильным направление в настоящее время на модификацию главных компонентов клеточной мембраны, вовлечённых в основные тропы трансдукции сигналов, таких как Notch и Wnt3a (Stier S. et al., 2002). Дополнительные работы по изучению профиля экспресси ГСК ПК,

подразумевают в будущем понимание механизмов воздействия на самообновление, способность к росту и увеличение потенциала приживляемости этих клеток.

В настоящее время сделан важный прогресс в понимании роли МСК в поддержании и росте популяции ГСК *in vivo*. Важно отметить, что ГСК из ПК экспрессируют нейрональные белки и могут дифференцироваться в *глиальные* или подобные *нейронам* клетки (МсGuckin C.P., 2004). Основываясь на вышеназванных свойствах клеток ПК, выполненные исследования на экспериментальных моделях нейродегенеративных заболеваний, подтвердили, что клетки ПК экспрессируют нейрональные маркеры, способны образовывать нейрон-подобные клетки, что приводит к улучшению неврологической симптоматики. Механизмов, которые предположительно задействованы в улучшении неврологической симптоматики, — несколько. Во-первых — высвобождение ростовых факторов и цитокинов клетками ПК; вовторых — неоваскуляризация ишемической зоны; в-третьих — стимуляция регенерации скелетной мускулатуры прогениторными клетками ПК без эффекта длительного приживления (Коропеп J.К., 2007).

МСК ПК представляют собой вторую главную популяцию и обладают фенотипом, который наиболее всего похож на ЭСК. Кроме типичных для МСК маркеров таких как CD105(SH2), CD73(SH3), CD44, они ещё экспрессируют маркеры ЭСК, такие как Oct-4, которые необходим для ингибирования тканеспецифичных генов, и таким образом поддерживает свойство самообновления и плюрипотентности (Greco S.J., 2007). Костный мозг (КМ) и клетки ПК традиционно считаются двумя основными источниками получения МСК и действительно содержат большинство клеточных популяций мультипотентных предшественников, пригодных не только для научного изучения, но и для клинического применения. Недавно впервые продемонстрировали увеличение количества МСК из пуповинной крови для клинического применения, при культивировании которой не использовалась бычья сыворотка (Reinisch A. et al., 2008). Использование фетальной бычей сыворотки при культуральных работах – основная проблема для дальнейшего клинического

применения из-за наличия ксеногенных белков для пациента, особенно при повторных применениях.

Работы по изучению дифференцировочной способности МСК из двух источников – КМ и ПК показали, что МСК из ПК проявляют больший остеогенный потенциал, но меньший адипогенный потенциал по сравнению с МСК из КМ (Chang Y.J. et al., 2006). Оба типа клеток отвечают на воздействие лептина, регуляторного белка, стимулирующего остеогенез, но блокирующего адипогенез, а также модулируются другими важными медиаторами Cbfa1 и PPAR2, соответственно. Более того, недавно теми же исследовательскими группами проведены работы с использованием метода ограниченного разведения, в результате которых обнаружены две популяции МСК в ПК с различиями в морфологическом фенотипе, но имеющие одинаковые поверхностные маркеры и одинаковый дифференцировочный потенциал, исключающий адипогенез (Chang Y.J. et al., 2006). Факт, что большинство клеток, имеющие фенотип СD90 - теряют способность подвергаться адипогенезу, может объяснить уменьшение потенциала МСК из ПК дифференцироваться в адипоциты (Chang Y.J. et al., 2006).

2.10.6. Резюме

Потенциальные терапевтические свойства фетальных СК из разнообразных фетальных источников постепенно переходят на клинический уровень через создание комплексного международного руководства по клиническому применению СК и их производных (Daley G.Q. et al., 2008). СК, полученные из этих фетальных, не затрагивающих фетуса тканей, в большинстве своём имеют мезенхимальный тип и преимущество в виде быстрого наращивания общего количества клеток при культивировании, что необходимо при клиническом использовании. Помимо этого, они ничтожно иммунодефицитны, не обладают признаками формирования тератом и не вызывают этических проблем. В ближайшем будущем эти особенности позволят провести клинические испытания клонально полученных МСК для лечения различных заболеваний. Ввиду того, что совсем недавно были получены производные ЭСК, которые называются сейчас 58

индуцированные плюрипотентные клетки, предполагается, что имеются как минимум 2 разных статуса плюрипотентных клеток: или как эпибластные прогениторы, или как плюрипотентные прогениторы поздних стадий гаструляции эмбриона (Rossant J., 2008). Индуцированные плюрипотентные клетки получают благодаря репрограммированию взрослых клеток, типа фибробластов (Jaenisch R., Young R., 2008). Однако, недавние исследования разнообразных типов фетальных СК, подтвердили, что они представляют собой новый класс СК, располагающихся по развитию и деятельности между ЭСК и взрослыми СК, сочетающими в себе особенности плюрипотентности и мультипотентности без выводов о том, что они могут создать любую ткань (Gilbert S.F. et al., 2005; Gilbert S.F., 2006; Emanuel P., 2007). Однако, выделение исключительного статуса для данных клеток, как источника получения плюрипотентных клеток, в ближайшем будущем необходимо для того, чтобы лучше понимать разнообразные механизмы репрограммирования как фетальных, так и взрослых дифференцированных клеток.

Обобщая полученные сведения, выделим несколько особенностей *фетальных* СК:

- 1. Разнообразные типы фетальных СК
- фетальные СК научились изолировать из нескольких тканей (амниотическая жидкость, Вартонов студень, амнион, плацента, пупочный канатик);
- они получаются непосредственно из фетуса или структур окружающих фетус;
- они представляют идеальный источник клеток для восстановительной медицины, потому что их легко получить, они имеют высокий пролиферативный потенциал, не формируют тератом и не имеют проблем связанных с ЭСК;
- их функциональной особенностью является то, что они представляют собой популяцию клеток между ЭСК и взрослыми СК.
 - 2. СК из амниотической жидкости
- представляют собой гетерогенную популяцию происходящую из всех трёх зародышевых слоёв;
- клонально нарощенные МСК, полученные из амниотической жидкости экспрессируют маркеры СК (*Oct-4*, *Nanog*, *SSEA-4*);
 - имеют широкий спектр дифференцировочного потенциала;

- клетки $CD117^+$ из популяции СК *in vivo* проявили свойства плюрипотентных СК.
 - 3. Клетки из Вартонова студня
 - недавно выделены и охарактеризованы;
- экспрессируют маркеры ЭСК (*Oct-4*, *Nanog*, *SSEA-4*) без маркеров МСК;
- исследования на животных показали их способность восстанавливать поражённые мышечные ткани.
 - 4. СК из амниотической оболочки
- амниотическая оболочка происходит из эпибласта после 8 дня развития и состоит из 3 слоёв;
- СК, полученные как из внутреннего слоя (амниотические эпителиальные клетки), так и наружного слоя (МСК амниотической оболочки) проявляют разнообразную степень дифференцировочного потенциала;
- как эпителиальные, так и МСК амниотической оболочки имеют дозозависимый и контактзависимый иммуномодуляторный эффекты, что крайне важно при аллогенной тканевой инженерии.
 - 5. СК из плаиенты
 - охарактеризовано несколько популяций СК из плаценты;
- они экспрессируют маркеры плюрипотентности (SSEA-4, Oct-4, Stro-1, Tra1-81), типичные маркеры МСК и имеют широкий спектр дифференцировки;
- способны *in vivo* дифференцироваться в нейрональные и глиальные клетки, инсулин-позитивные клетки и гепатоциты, а также создавать клапанные структуры на носителях.
 - 6. СК из пуповинной крови
- становятся основной клеточной популяцией мультипотентных СК для терапевтического применения;
- большинство исследований сфокусировано на МСК и $CD34^+$ гемопоэтических СК;
- представляют собой две популяции МСК, имеющих похожие маркеры, но разный потенциал дифференцировки.

Глава III

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Собственные результаты

Работа выполнялась в рамках государственного контракта и была направлена на получение альтернативного источника СК для использования в последующем в восстановительной и реабилитационной медицине, в частности, у больных с хроническим повреждением миокарда. Мы выполняли работу со стволоклетками. полученными ИЗ менструальной (МенСК). Учитывая выраженную инвазивность способов и методов получения МенСК в настоящее время, нами было спроектирован и создан опытный образец устройства для сбора клеточных фракций из менструальной крови. В результате был получен патент № 93268 от 27 апреля 2010. Данное устройство позволяет неинвазивно получить клеточный материал для выделения в последующем при культуральных работах эндометриальных СК.

Работа была проведена на добровольных донорах. Доноры: женщины от 20 до 30 лет, здоровые (без хронических заболеваний сердца, печени, почек и поджелудочной железы). Общее количество доноров составило 9 человек. Перед получением биологического материала кровь доноров проверяли на наличие антител к *HIV-1*, *HIV-2*, гепатиту B, гепатиту C, *VDRL*, вирусу папилломы и трипаносомам.

Анализ образцов проводили при помощи проточного цитометра *FACScalibur* (*BD Biosciences*) с программным обеспечением *CellOuest*.

Фенотип популяции СКЭ не изменился в процессе культивирования после 2,4 и 8 пассажей и оставался стабильным на всех пассажах. Фенотип популяции СКЭ был определён как *CD11b*⁻, *CD14*⁻, *CD34*⁻, *CD45*⁻, *CD44*⁺, *CD79*⁺, *CD90*⁺, *CD105*⁺.

В результате работ были получены убедительные данные о выраженной дифференцировке СК эндометрия в адипогенном, остеогенном, миогенном и, в частности, кардиомиогенном на-

правлении. Эти данные свидетельствуют о высоком дифференцировочном потенциале СК эндометрия.

Используя методику иммуноцитохимического окрашивания с используя методику иммуноцитохимического окрашивания с использованием антител, определяли наличие нестина, виментина, гладкомышечного альфа-актина в колониях СК эндометрия до 8 пассажа. Полученные результаты говорят о высокой экспрессии данных белков, что свидетельствует о направленной дифференцировке СК эндометрия в кардиомиогенном направлении и сохранении потенциала клеток.

В активно пролиферирующих культурах клеток есть риск возникновения анеуплоидий хромосом (изменения числа копий последовательностей ДНК). Это может привести к развитию мутации в клеточной популяции или трансформации клеток с нормальным фенотипом в раковые клетки. Наличие анеуплоидий проверяли методом сравнительной геномной гибридизации. Результаты компьютерного анализа реакции гибридизации тестируемой и контрольной ДНК с хромосомами метафазной пластинки периферийных лимфоцитов исключили возникновение числового нарушения хромосом в исследуемом образце.

числового нарушения хромосом в исследуемом образце.

Для подтверждения результатов исследования были выполнены работы на лабораторных животных. Цель исследования заключалась в оценке эффективности клеточного трансплантата СК эндометрия, индуцированных в кардиогенном направлении (СКЭ-К) при однократном введении в сердце через 30 суток после перенесённого острого инфаркта миокарда у самцов крыс СD для экспериментального обоснования применения этих клеток при восстановительном лечении травматических и дегенеративных заболеваний миокарда в клинической практике.

Смертность животных была одинаковой в группах после введения физиологического раствора или СКЭ-К (4 животных из 16 и 3 животных из 15, соответственно). Проявление внешних клинических признаков боли и дистресса у инфарктных животных отмечалось в меньшем количестве случаев ко 2-ой неделе после введения СКЭ-К по сравнению с контрольной группой (24% и 50%, соответственно). Значения массы тела и толерантность к физической нагрузке животных контрольной и опытной групп в ходе исследования достоверно не отличались.

опытной групп в ходе исследования достоверно не отличались.

После введения СКЭ-К клеток по сравнению с контрольной группой был отмечен более высокий уровень среднего АД (через 2 недели, 88 мм рт.ст и 79 мм рт.ст, соответственно) и ЧСС (через 4 недели, 265 уд/мин и 216 уд/мин), а также более высокое значение максимального давления в левом желудочке (136 мм рт.ст. относительно 116 мм рт.ст.). Значения индексов контрактильности миокарда между группами, получавшими физиологический раствор или СКЭ-К, достоверно не отличались. Однако, скорость прироста давления в левом желудочке (+dp/dt) увеличивалась только после введения СКЭ-К по сравнению со значением до введения на 30-й день после инфаркта, что является косвенным фактом восстановления инотропной функции сердца.

Анализ ЭКГ показал, что через 2 недели после введения СКЭ-К по сравнению с контрольной группой увеличивалась амплитуда зубца Р, что связано, вероятно, с развитием лёгочной гипертензии, а через 4 недели наблюдалось уменьшение продолжительности зубца Т, что расценивалось как уменьшение зоны ишемии.

Флюоресцентно меченые СКЭ-К выявлялись в 49% в мио-карде, в 47% – в селезёнке, в 3% – в печени, 1% – в лёгких. Через 2 и 4 недели после трансплантации отмечали одинаковое распределение клеток в органах. В селезёнке, печени и лёгких СКЭ-К выявляли равномерно по всем органам, в сердце клетки локализовались только в области рубцовой ткани, не входили в состав стенок кровеносных сосудов, соединительной ткани, и обнаруживались в непосредственной близости от кардиомиоцитов перифокальной зоны или нормального миокарда. Трансплантация клеток не приводила к уменьшению размера рубца, не изменяла скорость и степень ремоделирования левого желудочка, но приводила к утолщению стенки сердца в области рубца (48,9% относительно 37,2% через 2 недели и 29,5% относительно 27,0% через 4 недели после введения).

В печени, легких и селезёнке были выявлены умеренные морфологические признаки застойной сердечной недостаточности, которые можно рассматривать как реактивные, в рамках постинфарктного кардиосклероза. Других патологических признаков, очагов воспаления, очагов фиброза, образования оссификатов или опухолевых образований в исследованных органах выявлено не было.

Можно утверждать, что трансплантированные СКЭ-К мигрировали и выживали в исследуемых органах в течение одного месяца, не дифференцировались в клетки кровеносных сосудов и, предположительно, дифференцировались в кардиомиоциты и фибробласты, и участвуя в формировании рубца.

Таким образом, результаты данного исследования с использованием крысиной модели постинфарктного кардиосклероза демонстрируют, что метод трансвентрикулярной интракоронарной трансплантации СК эндометрия, индуцированных в кардиогенном направлении является эффективным, обеспечивает доставку клеток в область повреждения. Трансплантированные клетки предположительно дифференцируются в кардиомиоцимы, фибробласты и участвуют в формировании рубца в зоне инфарктного повреждения миокарда; при этом наблюдается улучшение функциональных показателей сердечно-сосудистой системы. Однократное интракоронарное введение СКЭ-К клеток крысам СD в дозе 25 млн. кл/кг не вызывает патологических изменений гистоструктуры печени, легких и селезёнки.

В результате работы разработан пошаговый протокол криоконсервации полученных культур СК эндометрия. Разработан оптимальный алгоритм криоконсервации, позволяющий максимально сохранить жизнеспособность клеток.

Произведена оценка свойств СКЭ после реконсервации по разработанному протоколу криоконсервации. Было получены результаты сохранения жизнеспособности выше 95%, что говорит о качественном алгоритме криоконсервации культур клеток.

На основании полученных данных была произведена разработка технологического регламента по культивированию и получению клеток направленной дифференцировки из СКЭ. Пошаговый протокол позволяет воспроизвести полученные результаты в направленной дифференцировке СК эндометрия. Данная работа была выполнена в рамках государственного

Данная работа была выполнена в рамках государственного контракта № 02.512.12.2058 от 22 мая 2009 года.

Глава IV

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

4.1. Клинические результаты

Результаты применения клеточных технологий при кардиомиопатиях. Данная группа пациентов составили 13 человек, из них 9 человек — основная группа и 4 человека — контрольная. Средний возраст пациентов составил 35±9 лет. В основной группе было 7 мужчин и 2 женщины, в контрольной — 1 женщина и 3 мужчин. У всех больных заболевание возникло после вирусной инфекции. Критерии включения:

- связь заболевания с вирусной инфекцией;
- фракция выброса (ФВ) менее 35 по данным Эхо-КГ;
- отсутствие онкологических и аутоиммунных заболеваний;
- добровольное согласие.

В данной группе пациентов под контролем витальных показателей, клетки вводились системно, после установки внутривенного катетера размером 20G в кубитальную вену. Повторное введение клеток выполнялось через 30 ± 3 дней.

Учитывая характер и тяжесть заболевания, мы использовали только фетальные клетки, которые являются более эффективными по сравнению с аутологичными. Достаточно молодой возраст и тяжёлая патология не внушали оптимизма от использования аутологичных клеток, что явилось доводом для применения только фетальных клеток. По причинам тяжести заболевания и повторности выполнения процедуры решено было отказаться от других способов введения клеток: интракоронарного, интрамиокардиального и эндокардиального, остановившись на самом минимально травматичном методе введения. Процедуры, как первичные, так и вторичные, все пациенты, перенесли без особенностей. Осложнений не выявлено. Диагностика проводилась с использованием инструментария и приборов, которые имеются практически во всех стационарах. В частности, на контрольных точках до введения (P_0) через $1(P_1)$, $3(P_2)$ и $6(P_3)$ месяцев выполнялись исследование биохимических показателей крови, общие анализы крови и мочи, Эхо-КГ, нагрузочные пробы, опрос по стандартизированным европейским опросникам. Достоверно значимых изменений в общих анализах крови и мочи не выявлено. В биохимических показателях отмечено уменьшение белков воспаления, в частности С-реактивного белка. Результаты Эхо-КГ показали достоверное увеличение фракции выброса (ФВ) от 5 до 12 абсолютных единиц, что составило в относительных единицах улучшение сократительной функции сердца до 43%. У некоторых пациентов отмечено уменьшение размеров сердца, оцениваемое по Эхо-КГ, хотя об этом говорить с достоверностью из-за небольшого количества наблюдений мы не можем. Те не менее, остаётся факт, что тонус сердечной мышцы, за счёт которого увеличивается ФВ, возрастает. К 3-ем месяцам увеличилась устойчивость к физической нагрузке и её продолжительности. К 6 месяцу ни у одного из пациентов основной группы ухудшения состояния не зафиксировано. Дополнительных госпитализаций не потребовалось. Результаты опросников представлены в табл. 1.

Таблица 1 Результаты показателей обследования основной группы

Показатели	Основная группа		Контрольная	
	SF36(PH/MH)	EQ-5	SF36(PH/MH)	EQ-5
P_0	37,52/38,85	0,401/40	34,37/59,32	0,508/45
\mathbf{P}_1	44,04/60,10	0,437/45	34,37/59,32	0,508/45
P_2	47,58/69,60	0,508/56	34,37/59,32	0,508/45
P_3	46,77/66,08	0,508/55	34,37/59,32	0,508/45

Примечание: Здесь и далее SF36 – опросник; EQ-5 – опросник; PH-оценка физического компонента здоровья; МН-оценка психологического компонента здоровья. Контрольные точки P0-до введения клеток, P1-через месяц после введения клеток, P2-через 3 месяца, P3-через 6 месяцев после введения клеток.

Механизмы коррекции патофизиологических нарушений при *кардиомиопатиях* при помощи клеточных технологий вытекают из особенностей повреждения миокарда. В частности, вирусная инфекция приводит к тяжёлым поражениям сердца. Естественно, что самостоятельно вирус вызвать поражение мио-

карда может в редких случаях, как правило, при совокупности многих факторов, среди которых можно выделить генетические особенности. В развёрнутых стадиях сердечная недостаточность приводит к ухудшению качества жизни пациента с тяжёлыми ограничениями ежедневной активности пациента и высокими затратами на лечение. Патофизиологическая основа сердечной недостаточности – гибель кардиомиоцитов, которая приводит к недостаточной насосной функции сердца. В терминальных стадиях сердечной недостаточности обычно требуется более радикальное лечение – трансплантация сердца, которая в настоящее время в России сведена практически к нулю по многим причинам, в частности законодательной и экономической. При такой ситуации клеточные технологии (КТ) являются обнадёживающей возможностью продления и, самое важное, изменения качества жизни пациентов.

Преимуществом вводимых нами клеток являлась их гетерогенность, т.е. в своём составе они содержали не только гемопоэтические прогениторы, но также и мезенхимальные. Таким образом, нам удалось одномоментно воздействовать практически на все звенья восстановления сократительной способности миокарда. Поступление в кровь реципиента большого количества «свежих» цитокинов запускает целый каскад реакций, что приводит к увеличению выживаемости кардиомиоцитов реципиента и, соответственно, к улучшению сократительной функции миокарда. Каскад реакций заключается в а) уменьшении оксидативного стресса, б) увеличении экспрессии паракринных факторов в) увеличении экспрессии антиапоптозных факторов и г) ангиогенных факторов.

4.2. Направления клеточной терапии в кардиологии

В последние десятилетия концепция восстановления миокарда очень быстро перешла от лабораторных разработок и научных изысканий в клинику для проведения клинических исследований. Проведённый анализ данных исследований подтверждает, что применение КТ приводит к улучшению фракции выброса левого желудочка (Иванов Д.В., 2009; Abdel-Latif A. et al., 2007; Lipinski M.J. et al., 2007). Первичная цель всех исследований при использовании стволовых и прогениторных клеток была в улучшении функций миокарда и уменьшение повреждённой, рубцово-изменённой ткани миокарда жизнеспособными кардиомиоцитами. Наиболее вероятно, что успех клеточной терапии при ишемизированном миокарде связан с паракринными и проангиогенными эффектами введённых клеток (Wollert K.C., Drexler H., 2005; Dimmeler S. et al., 2008). Продолжается поиск оптимального пути введения клеток, дозировки, отбор пациентов для применения клеточных технологий, а также идентификация новых более эффективных клеточных популяций. Рассмотрим возможные направления дальнейших исследований.

4.2.1. Собственные СК сердца

Несколькими независимыми группами исследователей было обнаружено присутствие небольшого кластера клеток Sca-I+, c-Kit+ и клеток SP (side population)+ в предсердии и верхушке сердца. Данную группу сердца назвали co6cmвeнныe CK cepdya (CCKC), и они наиболее часто обнаруживаются во время первых двух недель постнатального периода, который исчисляется сразу после родов. Доказано, что асимметричное деление ССКС приводит к появлению новых kapduomuoyumos (Messina E. et al., 2004). ССКС обладают свойством самообновления. У взрослого человека данная группа клеток находится в состоянии покоя в своих нишах. При возникновении ишемии ткани миокарда ССКС активируются благодаря паракринным эффектам и начинают делиться. Как правило, в повседневной жизни объем повреждений при инфаркте миокарда и скорость повреждений таковы, что не удаётся компенсировать дефекты благодаря делению собственных СК сердца (Oh H. et al., 2003).

Экспериментальными работами доказано, что ССКС могут быть эффективно изолированы из миокарда с помощью чрескожной биопсии и благодаря культуральным работам размножены до количества необходимого для восстановления миокарда (Messina E. et al., 2004). Работы на экспериментальных животных показали улучшение сократимости, уменьшение размеров инфарктной зоны. В настоящее время имеется несколько клинических исследований, в которых оценили безопасность и эффек-

тивность использования ССКС у больных с ишемической кардиомиопатией (www.clinicaltrials.gov; NCT00474461, NCT00981006). Данный вид клеток может быть введён интракоронарно в инфарктную зону или произведено непосредственное обкалывание СК малофункциональной, но жизнеспособной области миокарда (Smith R.R. et al., 2007).

4.2.2. Генетически обработанные прогениторные клетки

Большое количество клинических исследований выполняется с использованием аутологичных клеток, полученных из костного мозга пациента. Данные исследования выполняются с использованием гетерогенной популяции клеток. Как правило, мононуклеарные клетки, полученные из костного мозга с помощью центрифугирования, содержат коммитированные клетки, небольшое количество прогениторных клеток и даже незначительное количество СК. Степень улучшения сократимости миокарда и улучшение перфузии поражённой области чрезвычайно разнообразно и скорее всего клинические эффекты, полученные в исследованиях с использованием аутологичных костномозговых клеток зависят от функциональной способности и количества прогениторных и СК, которые удаётся получить от пациента (Wollert K.C., Drexler H., 2005; Wojakowski W. et al., 2007; Dimmeler S. et al., 2008; Ratajczak M.Z. et al., 2008). Большая вариабельность результатов зависит от возраста пациента, длительности заболевания, тяжести болезни и многих других факторов. Многочисленными работами показано, что у пациентов с диабетом эндотелиальные прогениторы, полученные из их костного мозга, имеют более низкую функциональную способность по сравнению с клетками от пациентов без сахарного диабета. У пациентов с сахарным диабетом отмечено также незначительное количество циркулирующих плюрипотентных клеток. У пациентов с ишемической кардиомиопатией в костном мозге мало эндотелиальных прогениторных клеток и их миграционная способность резко ухудшена (Kissel C.K. et al., 2007; Wojakowski W. et al., 2009). В других работах продемонстрировано укорочение теломер в прогениторных клетках, полученных из костного мозга и периферической крови у пациентов с поражением коронарных артерий (Spyridopoulos I. et al., 2008, 2009). В последнее время мнение, что введённые клетки вносят непосредственный вклад в восстановление миокарда, было изменено. Сейчас считается, что функциональное улучшение, полученное в клинических исследованиях, обусловлено косвенными паракринными эффектами введённых клеток. Возможность генетической обработки клеток представляется теперь наиболее возможной и может улучшить функциональные способности вводимых клеток, включая высвобождение клетками вазоактивных и протективных субстанций. Другое направление для генетической инженерии — усиление сигнальных путей, приводящее к улучшению клеточной выживаемости, хоуминга и приживаемости клеток (Penn M.S., Mangi A.A., 2008).

Одним из важных факторов для мобилизации прогениторных клеток и получения эффекта клеточной терапии является эндотелиальная синтаза оксида азота (eNOS), которая увеличивает миграционную способность клеток. Повышенная выработка или усиление eNOS улучшает миграцию СК, вызванную SCDF-1, который является основным хемокином, регулирующим мобилизацию клеток, хоуминг и приживление. Данная тактика усилила ангиогенез на лабораторных животных (Sasaki K. et al., 2006; Kupatt C. et al., 2007). В клинике эта методика была апробирована в исследовании ENACT-AMI (расширенная ангиогенная клеточная терапия острого инфаркта миокарда), когда использовались эндотелиальные прогениторные клетки с повышенной выработкой eNOS. Клетки были выделены с помощью афереза и трансфецированны человеческим eNOS-геном. Были получены положительные результаты у пациентов с использованием генетически модифицированных клеток в виде улучшения фракции выброса левого желудочка после 6 месяцев (www.clinicaltrials.gov; NCT00936819).

4.2.3. Аллогенные костномозговые клетки

К аллогенным клеткам относятся и фетальные клетки и клетки пуповинной крови. В данном разделе мы остановимся именно на аллогенных клетках из костного мозга донора. Функциональная недостаточность аутологичных клеток, полученных

у пациентов с хронической сердечной недостаточностью может резко ограничить получение положительного результата, а генетическая модификация таких клеток не всегда возможна, поэтотическая модификация таких клеток не всегда возможна, поэтому необходим поиск способов решения. Одним из них является использование аллогенных клеток от здоровых доноров, содержащих МСК. В данном случае они являются лучшими, потому что они иммунопривилегированы и не отторгаются из-за высвобождения иммуномодулирующих факторов и ингибирования Т-клеточной пролиферации. МСК составляют малую часть клеток костного мозга (0,001–0,01% клеток), однако они могут быть получены из жировой ткани. Самое важное, что они могут быть размножены *in vitro* и криоконсервированы (Pittenger M.F., Martin B.J., 2004; Pittenger M.F., 2008). Таким образом, у пациентов с острым повреждением миокарда или девожелулочковой ентов с острым повреждением миокарда или левожелудочковой недостаточностью появляется возможность дополнительного спонедостаточностью появляется возможность дополнительного спо-соба лечения, не дожидаясь результатов культивирования собст-венных клеток. На рынке даже появились клеточные продукты ти-па «*Prochymal*», которые проходят клинические испытания у па-циентов с сердечной недостаточностью (www.clinicaltrials.gov; NCT00877903). Потенциал мезенхимальных стромальных клеток, предифференцированных в кардиомиоцитарном направлении, продолжает исследоваться. Благодаря биоинженерии, МСК могут быть преобразованы для повышенной экспрессии факторов, которые увеличивают дифференцировку и приживаемость (Cheng Z. et al., 2008). Ещё одно направление потенциального интереса для аллогенной трансплантации – взрослые мультипо-тентные прогениторные клетки (MAPC) (Van't Hof W. et al., 2007).

4.2.4. Популяция VSELs клеток

В костном мозге взрослого человека содержатся популяции клеток, которые могут вносить свой вклад в восстановление миокарда и эндотелия. Так же в костном мозге находиться небольшая популяция негемопоэтических клеток, которые демонстрируют морфологические и функциональные свойства эмбриональных плюрипотентных CK (PSC). Маленький размер (3-6 µm), наличие PSC маркеров, чёткие морфологические признаки (открытый хроматин, большое ядро, узкая оправа цитоплаз-

мой с множественными митохондриями) и способность дифференцироваться в 3 зародышевых листка – позволило назвать данные клетки *«очень маленькими эмбрионально-подобными стволовыми клетками»* (VSELs-клетки) (Kucia M. et al., 2006, 2008; Wojakowski W. et al., 2007). Предполагается, что VSELs-клетки происходят из СК эпибласта и формируют пул покоящихся PSC, находящихся в костном мозге, сердце и других органах во время раннего органогенеза (Ratajczak M.Z. et al., 2007). Присутствие VSELs-клеток было обнаружено в пуповинной крови и периферической крови взрослых (Ratajczak M.Z. et al., 2008, 2009). Во время острого инфаркта миокарда и экспериментального инфаркта миокарда у мышей отмечается быстрая мобилизация VSELs-клеток из костного мозга в периферическую кровь. На циркулирующих VSELs-клетках найдены плюрипотентные маркеры, такие как ранний кардиальный и эндотелиальный транскрипционный факторы (Wojakowski W. et al., 2009). Эти находки подтверждают, что циркулирующие *VSELs*-клетки из костного мозга могут быть важным механизмом в восстановлении миокарда. На экспериментальных моделях острого инфаркта миокарда у мышей прямое интрамиокардиальное введение VSELs-клеток улучшило общую и региональную сократимость левого желудочка и уменьшило гипертрофию миокарда, причем удалось это сделать небольшим количеством клеток (Dawn B. et al., 2008).

4.2.5. Преднаправленные мезенхимальные кардиопоэтические клетки

Плюрипотентные и мультипотентные клетки могут дифференцироваться в различные клеточные линии. Данная предпосылка обусловила идею подготовки клеток факторами, которые имеют характеристики раннего эмбрионального развития сердца для направления их дифференцировочного потенциала в кардиальном направлении. Эти сигнальные факторы были идентифицированы с помощью сравнительного геномного и протеомического анализа, осуществлённого на эндодермальном секретоме, который в паракринной манере управлял унипотентными кардиомиоцитами коммитированными из ЭСК (Faustino R.S. et al., 2008;

Веһfаг А. et al., 2008; Arrell D.K. et al., 2008). Это новое направление в настоящее время проходит клиническое испытание на 2 и 3 фазах. В исследование включены 240 пациентов со 2–3 классом сердечной недостаточности по *NYHA*, с фракцией выброса, сниженной до 15–40% и наличием в анамнезе инфаркта миокарда. Пациентам вводились аутологичные МСК из костного мозга, обработанные с помощью сигнальных факторов в виде «кардиомиогенного коктейля». Введение осуществлялось в дисфункциональный, но жизнеспособный миокард с использованием *NOGA* системы. Исследование продолжается. (www.clinicaltrials.gov; NCT00810238).

4.2.6. Индуцированные плюрипотентные СК

Индуцированные плюрипотентные СК (iPS) это плюрипотентные клетки, полученные с помощью преобразования взрослых соматических клеток, например фибробластов, с помощью повышенной экспрессии репрограмированных факторов, которые связаны с генами СК, таких как *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, c-Myc (Yamanaka S., 2007). Такое эпигенетическое репрограммирование приводит к изменению фенотипа взрослых клеток, что делает их схожими с эмбриональными СК, в частности по присутствию раннего эмбрионального маркера (SSEA-1) и способностью генерировать клетки из всех зародышевых листков у химерных животных после введения при ранней стадии эмбриогенеза. В отличие от ЭСК, использование индуцированных плюрипотентных клеток не несёт этических проблем, так как они генетически идентичны донору (Yamanaka S., 2007). Исследования показали, что iPS клетки эффективно дифференцируются в линии клеток сердца, что проявляется в экспрессии ранних кардиальных маркеров. Экспрессия маркеров возникает из-за кардиальной структуры протеинов, которая приводит к формированию спонтанно сокращающихся кардиомиоцитов, связывающих разорванные между кардиомиоцитами связи. По некоторым физиологическим характеристикам кардиомиоциты, полученные из iPS клеток не отличаются от *кардиомиоцитов*, полученных из ЭСК, но имеются некоторые различия в электрофизиологических характеристиках (Martinez-Fernandez A. et al., 2009). Уже проведены работы по использованию *iPS* клеток для регенерации миокарда на мышиных моделях острого инфаркта миокарда. При введении интрамиокардиально $2x10^5\,iPS$ клеток они стабильно прижились и не отторгались в течении месяца в миокарде иммунокомпетентных реципиентов. Отмечено достоверное улучшение сократимости левого желудочка и увеличение толщины стенки желудочка. Гистологические данные подтвердили, что iPS клетки участвовали в регенерации миокарда, эндотелия и уменьшали фиброз (Nelson T.J. et al., 2009). Можно смело говорить, что создание индуцированных плюрипотентных клеток открыло новый виток научных исследований в изучении регенерации миокарда. Сейчас исследования направлены на изучение способности iPS клеток формировать клетки предсердий, желудочка и проводящей системы (Gersh B.J. et al., 2009). До прихода этих идей в клинику достаточно далеко, потому что необходимо изучить отдалённые результаты на лабораторных животных.

Отражённые в данной главе новые направления в развитии клеточных популяций, которые будут стремиться в клинику, докажут свою эффективность и жизнеспособность со временем. В настоящее время в клинике продолжают совершенствоваться и отрабатываться уже апробированные методы и способы. Выводы о жизнеспособности того или иного вида клеточной популяции будет делать каждый специалист, основываясь на своём опыте или полученных знаниях.

Глава V

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРИ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ

5.1. Клеточные технологии при вирусном поражении печени

Мы акцентировали своё внимание на применении КТ у больных вирусным гепатитом В и С. Специально выбраны именно эти две формы, так как вирус гепатит А очень редко (менее 2% случаев) переходит в хроническую форму и вызывает цирротические изменения в печени. Вирус гепатита Д, как правило, идёт совместно с ХГБ. Встречаемость вируса гепатита Е в настоящее время крайне мала. Учитывая, что вирусы гепатита имеют внепеченочные источники локализации, мы не использовали у пациентов аутологичные клетки и применяли только аллогенные клетки. В качестве аллогенных клеток использовались фетальные клетки. Материалом для получения клеток служила фетальная печень 2-го триместра гестации. Весь клеточный материал проходил проверку для исключения вирусной, бактериологической и микологической контаминации. В дальнейшем клеточный материал криоконсервировался. Непосредственно перед введением клетки размораживали и проверяли жизнеспособность, которая составляла не менее 92%. В исследование были включены пациенты, которые не могли пройти полностью курс лечения пегилированными интерферонами и прервали его из-за осложнений (депрессии, лейкопении, диспепсии, аритмии).

В группе было 25 человек, из которых 5 человек (2 женщины и 3 мужчины) — контрольная группа, и 20 человек, из которых 18 мужчин и 2 женщины, — основная. Распределение пациентов по группам представлено в табл. 2.

Возраст в основной группе составил $43,2\pm5,6$ лет. В анамнезе у каждого из основной группы было не менее 2 попыток проведения курса лечения пегилированными интерферонами. Большинство пациентов (n=15) с хроническим гепатитом C (ХГС). Большинство пациентов вируса гепатита C было C подтипом C 3b, 5 пациентов — C подтипом вируса 1a.

Таблица 2 Распределение пациентов по группам

	Основная группа	Контрольная группа
Пол	Муж – 18; жен – 2	Муж – 3; жен – 2
Возраст	43,2±5,6	41±3,2
Вирус С	3b (10 чел.);	3b (2 чел.);
	1а (5 чел.)	1а (1чел)
Вирус В и D	В (3 чел);	В (1чел);
	В+D (2 чел)	В+D (1 чел)
Количество	20	5

Примечание: 1а – генотип вируса С; 3b- генотип вируса С

Клетки вводили системно после установки внутривенного катетера размером 20G. Во время процедуры введения проводился постоянный мониторинг витальных функций. Осложнений во время введения и в периоде наблюдения не выявлено. Все пациенты процедуры перенесли без особенностей. Перед введением клетки реконсервировались и в асептических условиях подготавливались. Клетки вводились минимум за месяц до начала курса противовирусной терапии.

Результаты оценивали ежемесячно. Данные представлены в табл. 3.

Результаты выполнения биопсии печени представлены в табл. 4. Оценка результатов проводилась по методике Knodell. Количество пациентов, которые дали согласие на проведение биопсии – 7 человек.

Все пациенты смогли пройти курс противовирусной терапии. Отмены препаратов не понадобилось. Пациентами отмечено, что курс противовирусной терапии перенесли намного лучше, чем попытки предыдущих курсов. У пациентов с вирусом гепатита С 3b после завершения курса противовирусной терапии в периферической крови при повторных исследованиях вирус не обнаруживался, что позволило считать их излечившимися. Данные по обнаружению вирусов в крови пациентов представлены в табл. 5.

Динамика изменения лабораторных показателей у больных с гепатитом С в основной группе

Сроки/	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
показатели								
АлАТ	123±23,5	126±13,5	83±3,5	86,3±6,5	102±21,1	96,9±3,5	87,1±6,5	102,7±13,5
AcAT	148±13,4	159±14,8	82±23,5	110±22,1	106±17,3	125,7±13,7	100±3,6	109±3,9
Эритроциты	4,5±0,5	4,2±0,4	4,2±1,1	4,5±0,9	4,1±0,3	4,1±0,1	4,2±0,3	4,5±0,1
Лейкоциты	4,1±0,4	4,5±0,5	5,9±3,5	3,2±0,2	5±1,3	2,9±0,2	3,9±0,3	3,8±0,5
Тромбоциты	170±22,6	173±23,7	147±22,2	152±16,6	126±19,3	120±11,5	115±9,9	121±7,5
MHO	1,2±0,1	1,3±23,5	1,2±23,5	1,4±23,5	1,5±23,5	1,5±23,5	1,4±23,5	1,4±0,1

Примечание: P0 – до введения клеток; P1 – начало противовирусной терапии, через месяц после введения клеток; P2 – 2 месяца; P3 – 3 месяца; P4 – 4 месяца; P5 – 5 месяцев; P6 – 6месяцев; P7 – через месяц после завершения курса противовирусной терапии.

Таблица 4

Результаты исследования биоптатов у больных с гепатитом В

Сроки/группа	P0	P1
Основная	12*	10,4*
Контрольная	11,5*	12*

Примечание: * – оценка результатов проводилась по методике Knodell. P0 – до введения клеток и начала терапии; P1 – после завершения противовирусной терапии

Таблииа 5

Динамика обнаружение маркеров гепатитов В и С

Группы/сроки		P0	P1
Основная	C 1a	antiHCV- пол.(5 чел)	antiHCV- пол.(3 чел) antiHCV- отр.(2 чел)
	C 3b	antiHCV- пол.(10 чел)	antiHCV- отр.(10 чел)
	В	HBsAg – пол.(5 чел)	HBsAg – пол.(5 чел)
Контрольная	C 1a	antiHCV- пол.(1 чел)	antiHCV- пол.(1 чел)
	C 3b	antiHCV- пол.(2 чел)	antiHCV- пол.(2 чел)
	В	HBsAg – пол.(5 чел)	HBsAg – пол.(5 чел)

Примечание: C1a, C3b – разновидности гепатита C. P0 – до введения клеток; P1 – через месяц после завершения курса противовирусной терапии.

У больных с вирусным гепатитом С генотип 1а — положительного результата удалось достигнуть у 50%. В ситуации с гепатитом В, который, как правило, протекал совместно с гепатитом Д излечения не достигнуто. Однако отмечено выраженное уменьшение синдрома цитолиза.

5.2. Клеточные технологии при невирусном поражении печени

Определена группа пациентов с токсическим поражением печени вследствие злоупотребления алкоголем. Наследственные поражения, поражения тяжёлыми металлами или лекарственными препаратами — исключились.

В данной группе исследовались 15 человек, из которых 12 – основная группа, и 3 – контрольная группа (табл. 6). У всех обследуемых отмечалось хроническое поражение печени после длительного злоупотребления алкоголем (стаж не менее 3 лет). Возраст пациентов 52,3±4,1 года. Основное требование по включению в группу – прекращение употребления алкоголя. Противопоказаний для проведения лечения с применением КТ не выявлено.

Таблица 6 Распределение пациентов по группам

		Основная группа	Контрольная
			группа
Пол	Мужчины	9	2
Пол	Женщины	3	1
Во	зраст (год)	51±5,5	52±1,2
Количество		12	3

Пациентам основной группы проводилось однократное введение *аллогенных* (фетальных) клеток в дозе 100 млн. Введение проводилось системное (внутривенное) под контролем основных витальных функций.

Таблица 7 Динамика изменения лабораторных показателей у пациентов основной и контрольной групп

Показатели/с	роки	P0	P1	P2	P3
AcAT	Осн	59±3,5	56±1,8	52±3,2	54±0,7
	Кон	53±2,4	56±2,5	52±3,1	61±0,2
АлАТ	Осн	45±2,5	40±1,4	43±1,1	39±2,1
	Кон	47±1,3	46±1,5	48±0,9	46±1,4
ГГТП	Осн	85±1,5	60±4,8	54±3,6	45±2,3
	Кон	74±2,7	68±1,3	59±3,4	90±0,2
ХЭ	Осн	11500±2300	9500±460	10000±1500	6500±760
	Кон	12900±1400	11500±1300	13500±280	10500±3243
Билирубин	Осн	32,4±0,3	28,2±0,9	26,1±1,1	24,3±1,2
	Кон	28,4±0,6	26,4±0,2	24,4±0,3	22,4±0,8
Эритроци-	Осн	4,4±0,5	4,9±0,4	4,2±1,1	4,5±0,9
ТЫ	Кон	4,8±0,3	4,2±0,7	4,4±1,6	4,7±0,2
Гемогло-	Осн	126±13,4	146±5,7	142±7,3	151±4,6
бин	Кон	130±5,2	132±4,6	134±3,8	132±4,3
Лейкоциты	Осн	4,1±0,4	4,5±0,5	6,9±0,8	8,2±0,8
	Кон	4,5±0,2	4,8±0,5	5,9±3,5	$7,2\pm0,2$

Примечание: Осн-основная группа; Кон-контрольная группа.

Группа	опросник	Контрольные точки					
Труппа	опросиих	P0	P1	P2	P3		
Основная	SF36(PH/MH)	40,53/47,16	46,34/72,08	56,77/67,51	56,77/67,51		
	EQ-5	0,761/60	0,810/80	0,827/80	0,827/80		
Контроль-	SF36(PH/MH)	40,53/47,16	45,83/49,20	46,35/56,86	46,35/56,86		
ная	EQ-5	0,761/60	0,707/60	0,707/70	0,707/70		

Динамика изменений по опросникам SF-36, EQ-5

Все пациенты получали стандартное лечение, включающее элиминацию этиологического фактора, высокоэнергетическую диету с большим содержанием белка, эссенциальные фосфолипиды, витамины группы В. На препаратах, полученных при биопсии — гистологические изменения, соответствующие воспалению в отсутствие признаков цирротической трансформации.

При анализе лабораторных и инструментальных данных, а также данных контрольных осмотров и опросников, мы выяснили, что не все пациенты прекратили потребление алкоголя. Наиболее чётко это проявлялось в контрольной группе.

Использование клеточных технологий в комплексном лечении пациентов с вирусным поражением печени обусловлено следующими механизмами:

- 1. Восстановление гепатоцитов. Длительно существующее инфицирование вирусом гепатоцитов неминуемо приводит их к гибели и выходу вируса в кровь и внедрение в новые клетки. Повреждённые клетки заменяются новыми или соединительной тканью. Вводимая суспензия аллогенных (фетальных) клеток содержит печёночные прогениторы, которые стимулируют образование и дифференциацию клеток от овальных через гепатоциты 1 порядка ко 2-ому и полностью дифференцированным гепатоцитам 3-го порядка.
- 2. Усиление выработки интерферонов. Интерфероны вырабатываются при повреждении клетки вирусом. Это защитный механизм. Подразделяются на α , β , λ . Интерферон- β ключевой компонент среди семейства интерферонов в клеточной защите

против ХГС, и также благодаря паракринному эффекту ограничивает распространение вируса от клетки к клетке (Gale Jr. M., Foy E.M., 2005), начинает определяться через 2 недели после инфицирования и держится в течение 2 месяцев после появления (Lazaro C.A. et al., 2007).

- 3. Стимуляция иммунной системы. Происходит через опосредованные эффекты. В гетерогенной суспензии находятся гемопоэтические СК. Известно, что печень на данных сроках развития выполняет кроветворную и иммунную функцию. Данные клетки стимулируют активизацию внутренних макрофагов печени. Важную роль в данном процессе играют «натуральные киллеры» (НК), особенно против гепатотропного вируса С. Эти клетки запускают цитолитическую функцию вирус-специфичных Т-клеток благодаря продукции интерферона, однако могут также напрямую вызывать апоптоз в инфицированных гепатоцимах. НК вызывают супрессию рибонуклеиновой кислоты вируса гепатита С, содержащегося в гепатоцимах. Уже имеются подтверждения, что персистенция вируса гепатита С может быть связана именно с неадекватным ответом НК на вирус гепатита С как в крови, так и в самой печени. В данном случае успех после применения интерферонов у больных с хроническим гепатитом С связывается с активизацией НК.
- 4. Депонирование в нишах СК. Сохранение в нишах прогениторных клеток, присутствующих в суспензии, позволяет пациентам перенести курс тяжёлой противовирусной терапии. Повидимому, клетки постепенно выходят в кроветворное русло и запускаются в работу.
- 5. Каскад ауто и паракринных эффектов. При запуске данного механизма идёт активная борьба между отложением нитей фибрина и резорбцией нитей коллагена. В данном механизме активное участие принимают клетки Ито (звездчатые), а также матриксные металлопротеиназы. Активно участвуют цитокины и ростовые факторы.

При токсическом поражении печени, в частности, алкоголем, проводимая лекарственная терапия принесла свой положительный эффект и, возможно, важным фактором в восстановлении основных функций печени была элиминация токсического агента. Однако достоверно отмечено, что скорость наступления

положительных эффектов и их выраженность превалировала именно в основной группе, где вводились ФК. По нашему мнению, данный эффект связан со стимуляцией процессов восстановления печени цитокинами и ростовыми факторами, которые в большом количестве присутствуют в клеточной суспензии, полученной из фетальной печени. Наибольшую роль в данной процессе играют несколько ростовых факторов, в частности фактор роста гепатоцитов (HGF), преобразовывающий фактор роста альфа (TGFa), гепарин связывающий эпидермальный фактор роста (HB-EGF). HGF и TGF а являются стимуляторами роста гепатоцитов в культуре, HGF продуцируется непаренхиматозными клетками в печени и воздействует на гепатоциты с помощью паракринных и эндокринных механизмов (Peddiaditakis P. et al., 2001). *TGFα* и *HB-EGF* относятся к семейству эпидермальных ростовых факторов и воздействуют через рецепторы на окислительное фосфорилирование, что приводит к репликации ДНК. *TGF* а продуцируется гепатоцитами и осуществляет функционирование через аутокринный механизм, так как гепатоциты продуцируют лиганды и содержат подходящие рецепторы для связывания (Mead J.E., Fausto N., 1989). *HB-EGF* связывает начало и прогрессию регенерации печени (Mitchell C. et al., 2004). Получается, что эти три фактора роста оказывают уникальное воздействие на репликацию и выживаемость гепатоцитов, а также необходимы для оптимальной регенерации. На фоне восстановления функциональных свойств клеток печени снижается токсическое действие аммиака, меркаптанов и ароматических аминокислот. На фоне снижения интоксикации улучшается психоэмоциональный фон, повышается физическая активность, что отражается на самостоятельной оценке пациентов своего здоровья выполненной с помощью специализированных опросников.

Глава VI

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И ПОВРЕЖДЕНИЕ НЕРВНОЙ ТКАНИ

Результатом повреждения спинного мозга является разрушение нервной ткани и, как следствие, утеря моторной и сенсорной функции. В настоящее время не имеется абсолютных методов восстановления повреждённой нервной ткани и сохранение функций зависит от степени ее повреждения. Надежды, возлагаемые на СК и прогениторные клетки, связаны со свойством данных клеток поддерживать восстановление повреждённой нервной ткани. Это подтверждено на экспериментальных моделях с повреждением спинного мозга. Разрабатываются технологии по направленной дифференцировке СК и прогениторных клеток в нейрональном и глиальном направлениях для последующего замещения повреждённой ткани. Опосредованный косвенный эффект на восстановление нервной ткани связывают нейропротективным и аксонрегенерирующим лействием трансплантированных клеток.

Во время эмбриогенеза СК пролиферируют, мигрируют и формируют организм. Во взрослом организме СК присутствуют во многих местах, и нервной системе, в частности (Altman J., 1962; The Boulder Committee, 1970; Graziadei P.P., Monti Graziadei G.A., 1980; Rakic P., 1985; McKay J.S. et al., 1997). Находясь в нервной ткани, они могут дифференцироваться в нейроны (Eriksson P.S. et al., 1998). С момента идентификации и характеристики СК их потенциал стал чрезвычайно перспективен для исследования возможности лечения повреждений спинного и головного мозга, а также дегенеративных поражений головного мозга (Snyder E.Y., 1992; Fisher L.J., Gage F.H., 1993; Snyder E.Y., Macklis J.D., 1995; Brüstle O., 1999; Polak J.M., Bishop A.E., 2006). Итак, СК определяются, благодаря их способности самообновляться и тотипотентности. Самообновление характеризуется способностью подвергаться асимметричному делению, в результате которого одна клетка остаётся стволовой, причём без признаков «старения», а вторая клетка начинает дифференцироваться в одном из направлений развития зародышевых листков.

Отметим, что СК долгое время могут находиться в «покоящемся» состоянии. Направление дифференцировки следующее: *то-тии-плюри-мульти-унипотентные клетки*, что соответствует уменьшению дифференцировочного потенциала клеток. *Плюри-потентные клетки* дифференцируются в *мультипотентные клетки* 3 зародышевых листков. Это эктодермальный слой, из которого происходит нервная ткань, мезодермальный слой (соединительная ткань, мышцы, кости, клетки крови) и эндодермальный слой (желудочно-кишечный тракт и внутренние железистые органы).

После повреждения спинного мозга включаются эндогенные процессы восстановления, свидетельствующие о том, что нервная ткань предпринимает попытки самостоятельной репарации. Шванновские клетки, отвечающие за миелинизацию и регенерацию в периферической нервной системе, начинают мигрировать из корешков спинного мозга в повреждённую ткань и обеспечивать процессы миелинизации аксонов спинного мозга (Franklin R.J., Blakemore W.F., 1993; Takami T. et al., 2002). мозга (Frankin R.J., Віакетоге W.F., 1993; Такаті Т. et al., 2002). В повреждённых нейронах увеличивается экспрессия генов связанных с регенерацией (Martens D.J. et al., 2002; Gardiner P. et al., 2005). Сразу же местно проявляется залповый выброс пролиферирующих взрослых стволовых и прогениторных клеток (Martens D.J. et al., 2002; Mothe A.J., Tator C.H., 2005; Ke Y. et al., tens D.J. et al., 2002; Mothe A.J., Tator C.H., 2005; Ke Y. et al., 2006). Однако, рост аксонов ограничен ингибиторами роста, на-кодящимися в олигоденроцитном миелиновом дебрисе и клет-ках, которые участвуют в формировании рубцовой ткани (Silver J., Millet J.H., 2004; Galtrey C.M. et al., 2007; Tian D.S. et al., 2007). Вновь появившиеся СК и прогениторные клетки функционально не интегрируются в повреждённую ткань спинного мозга. Таким образом, эндогенные регенераторные силы, которые проявляютобразом, эндогенные регенераторные силы, которые проявляются сразу после повреждения, не достаточны для восстановления повреждённого спинного мозга. Улучшение функционального исхода после повреждения спинного мозга может быть активировано с помощью нейропротективных мероприятий, которые будут ограничивать вторичные потери нервной ткани и, таким образом, уменьшать потерю функциональных свойств. Как альтернатива, функциональное восстановление может быть активировано методами ускоряющими рост аксонов, которые в результате приводят к репарации повреждённых и/или формированию

новых аксоновых связей, которые в свою очередь становятся вовлечёнными в передачу сигналов и соответственно восстановлению функциональных свойств. Хотя имеется некоторая неопределённость в отношении того, что стволовые и нейрональные прогениторные клетки могут стать неоценимым компонентом в стратегии восстановления повреждённого спинного мозга. Эти клетки могут становиться нервными клетками, которые уже в свою очередь могут поддерживать анатомическое или функциональное восстановление. Как вариант, они могут секретировать ростовые факторы, которые поддерживают нейропротективное действие и/или регенерацию аксонов. Потенциал СК или прогедействие и/или регенерацию аксонов. Потенциал СК или прогениторных клеток в восстановлении повреждённого спинного мозга сейчас активно изучается (Teng Y.D. et al., 2006; Coutts M., Keirstead H.S., 2008; Hardy S.A. et al., 2008). Стали понятны также и недостатки СК и прогениторных клеток (Chen C.P. et al., 2007; Zietlow R. et al., 2008). В последнее десятилетие СК изучались без включения чётких критериев СК как таковых, т.е. их чёткой идентификации. Следовательно, терапевтический потенциал истинных стволовых/прогениторных клеток все ещё не ясен. Другие аспекты, связанные с использованием стволовых/прогениторных клеток все ещё не ясен. Другие аспекты, связанные с использованием стволовых/прогениторных клеток все ещё не ясен. гениторных клеток для восстановления повреждённого спинного мозга, необходимо решить до начала широкого клинического применения в практике. Это вопросы получения клеток. Как клетки могут быть получены? Действительно так ли уж необходимо их дифференцировать в лабораторных условиях до введения пациенту? Как могут выжить пересаженные стволовые/прогениторные клетки? Каким образом избежать неконтролируемого деления и дифференцировки (Keirstead H.S. et al., 2005)? Вопросы улучшения функциональной интеграции трансплантированных клеток также остаются открытыми.

6.1. Механизмы воздействия на повреждённую нервную ткань

1. Замещение погибших клеток в повреждённом спинном мозге.

Принимая во внимание способность СК становиться любой клеткой организма, идея использовать их потенциал для стратегии замещения погибших клеток в повреждённом спинном моз-

ге продолжает оставаться крайне интересной. В соответствующей комбинацией ростовых факторов («индукционный коктейль») ЭСК могут быть использованы для получения нейронов и глиальных клеток (Liu S. et al., 2000; Billon N. et al., 2006). Данное утверждение было подтверждено на лабораторных моделях, когда нейроны, полученные из ЭСК, выживали и интегрировались после введения в повреждённый спинной мозг крыс (Deshpande D.M. et al., 2006). Было показано, что миелинизированные аксоны, полученные из мышиных ЭСК, приживались у породы миелин-дефицитных крыс (Brüstle O., 1999). Имеются и другие работы, подтверждающие верность указанных выше предположений. В частности, у крыс с повреждённым нормальным (без генетических дефектов) спинным мозгом пересаженные мышиные клетки, полученные из ЭСК мышей, улучшали функциональное восстановление (McDonald J.W. et al., 1999). Важно отметить, что клетки, полученные из ЭСК, были обнаружены в повреждённом спинном мозге и не погибли, подтверждая, что таким способом можно получить хорошие отдалённые результаты (Jendelova' P. et al., 2004). Человеческие ЭСК могут быть направлены в мультипотентные нервные предшественники (Carpenter M.K. et al., 2001), моторные нейроны (Li X.J. et al., 2005; Lee H. et al., 2007) и олигоденроцитные прогениторные клетки (Keirstead H.S. et al., 2005; Nistor G.I. et al., 2005). Сейчас уже получены результаты дифференцировки в зрелые олигоденроциты *in vitro* и *in vivo* (Nistor G.I. et al., 2005). Более того, эти клетки способны миелинизировать аксоны после введения в спинной мозг у миелин-дефицитных (*shiverer*) мышей и взрослых крыс (Keirstead H.S. et al., 2005). Нейральные прогениторные клетки (т.е. мультипотентные клетки, из которых развивается центральная нервная система) очень часто агрегируют в нейросферы. Продемонстрировано, как нейральные прогениторные клетки, введённые в повреждённый спинной мозг у крыс, предпочтительно дифференцируются в астроциты. Эти результаты говорят о необходимости разработки дифференцировочного протокола до введения клеток (Cao Q.L. et al., 2002). Интересно, что генетически модифицированные фетальные нервные предшественники активно экспрессируют белок noggin, который является антагонистом белка ВМР, дифференцируются

предпочтительно в нейроны и олигодендроциты. Введение таких клеток в повреждённый спинной мозг мышей приводил в исходе к улучшению функционального исхода (Setoguchi T. et а1., 2004). Однако, этот результат тем же самым методом не удалось воспроизвести другим исследователям (Enzmann G.U. et al., 2005). Человеческие нейральные прогениторные клетки, как правило, получают из эмбриона на стадии бластоцисты и затем в лабораторных условиях получают функциональные нейроны и глию (Nunes M.C. et al., 2003). После того как человеческие нейральные прогениторные клетки были введены в повреждённый спинной мозг крыс, некоторые из них были найдены дифференцированными в олигодендроциты. Более того, данные находки сопровождались улучшением функционального исхода (Cummings B.J., 2005, 2006).

МСК, полученные из костного мозга, также могут служить для терапевтических целей при восстановлении повреждённого спинного мозга (Nandoe Tewarie R.D., 2006; Parr A.M., 2007). Хотя продолжаются дискуссии (Castro R.F., 2002), показано, что определённые группы взрослых СК легко дифференцируются в костные, жировые клетки, а также клетки сухожилий и хрящей (Pittenger M.F. et al., 1999). Уже давно опубликовано, что эти клетки спокойно могут трансдифференцироваться in vitro в клетки печени (Petersen B.E., 1999), клетки скелетной мускулатуры (Wakitani S., 1995; Ferrari G. et al., 1995), кардиомиоциты (Makino S., Fukuda K. et al., 1999; Orlic D. et al., 2001) и клетки центральной нервной системы (Brazelton T.R. et al., 2000; Mezey E. et al., 2000; Sanchez-Ramos J. et al., 2000; Kohyama J. et al., 2001; Saito T. et al., 2003). Все эти факты делают МСК, полученные из костного мозга, перспективными для применения в методиках восстановления повреждённого спинного мозга. Из многих направлений медицины, где используются МСК, можно привести большое количество примеров, но наиболее часто - при восстановлении миокарда после различного рода повреждений – инфаркта, миопатии (Иванов Д.В., 2009; Saito T. et al., 2003; Eisenberg C.A. et al., 2006), нарушении мозгового кровообращения (Bang O.Y. et al., 2005), нейродегенеративных заболеваний (Lee J. et al., 2003; Sugaya K., 2005).

- 2. Стратегия нейропротекции в лечении повреждений спинного мозга должна стоять на первых рубежах по предотвращению увеличения объёма дефекта нервной ткани для того, чтобы в последующем иметь оптимальный исход лечения поражений спинного мозга. Показано, что нейральные прогениторные клетки могут защищать от эндотоксинов (Lu P. et al., 2003; Llado' J. et al., 2004). Они также секретируют разнообразные молекулы, которые могут защитить клетки от механизмов апоптоза, которые усиливаются экзо и эндотоксинами (Lu P. et al., 2003). Таким образом, получается, что введение означенных клеток в повреждённый спинной мозг в действительности оказывает нейропротективный эффект. Костномозговые стромальные клетки показали усиление нейропротективного эффекта при введении в повреждённый спинной мозг у взрослых крыс за счёт выделения большого количества ростовых факторов (Labouyrie E. et al., 1999; Garcı'a R. et al., 2004; Mahmood A. et al., 2004; Ye M. et al., 2005).
- 3. Ускорение регенерации аксонов вносит значительный вклад в восстановлении функций после повреждения спинного мозга. Способность нейральных прогениторных клеток секретировать разнообразные нейротрофические факторы свидетельствует о том, что они могут ускорять рост повреждённых аксонов (Lu P. et al., 2003; Llado' J. et al., 2004). Взрослые нейральные прогениторы имеют свойства выделять субстраты для кортикоспинальной регенерации аксонов после повреждения спинного мозга (Pfeifer K. et al., 2004). У клеток, напоминающих стволовые, которые были получены из оболочек обонятельного нерва, есть способность предохранять аксоны от распознавания ингибирующими рост факторами, что позволяет аксонам расти в область, где нет ингибирующих факторов (Ramon-Cueto A., 2000; Raisman G., Li Y., 2007).

В настоящее время идёт процесс перехода лабораторных разработок в клинику. Способствует данному процессу тот факт, что СК, полученные из костного мозга пациента, т.е. аутологичные, не имеет этических конфликтов? в отличие от использования СК, полученных из эмбриона. Напомним, что ЭСК отличаются от ФК сроком развития и, соответственно, получения. Тем не менее, по некоторым причинам, использование ЭСК 88

очень часто предпочтительнее, чем использование собственных (аутологичных) клеток в лечении заболеваний. В США использование человеческих ЭСК для восстановления повреждений спинного мозга было предложено биотехнологической компанией Geron из штата Калифорния. Надо отметить, что это самый прогрессивный штат в легализации исследований в области развития КТ. Сейчас применение собственных СК для лечения повреждения спинного мозга происходит во многих странах мира (Mathews D.J. et al., 2008). К примеру, в Эквадоре выполнены исследования по трансплантации аутологичных СК, полученных из костного мозга у 25 пациентов с поражением спинного мозга. Инвестором исследования выступала американская биотехнологическая компания из штата Калифорния PrimeCell Therapeutics. По результатам проведённой работы были получены обнадёживающие данные, в частности, у пациентов отмечено улучшение ходьбы и чувственное восприятие. Этот результат внушает оптимизм, что преодоление этических барьеров в скором времени может быть успешным для клинического применения ЭСК (Baptiste D.C., Fehlings M.G., 2007).

Потенциал ЭСК чрезвычайно велик, так как они могут дифференцироваться более чем в 200 видов различных клеток нашего организма (Sell S., 2008) и, при определённых обстоятельствах, даже в целый организм (Nagy A. et al., 1993). Человеческие ЭСК получают из эмбриона на стадии бластоцисты (Thomson J.A. et al., 1998), а также с помощью трансфера соматического ядра (Bakken A.M., 2006; Ballen K.K. et al., 2006) или партеногенетической активации яйцеклетки (Cibelli J.B. et al., 2002; Vrana K.E. et al., 2003). Полученные ЭСК не подвергаются старению и сохраняют высокую теломеразную активность и нормальный клеточный сигнальный цикл, что и объясняет их высокую скорость пролиферации в культуре (Murry C.E., Keller G., 2008; Park Y.B. et al., 2008). Эти пластические характеристики делают ЭСК применимыми для стратегии восстановления повреждённого спинного мозга и нервной ткани. Однако, трансплантация ЭСК может вызывать тератомы из-за неконтролируемого роста, о чем уже имеются публикации (Ray S. et al., 2006; Nussbaum J. et al., 2007; Shiras A. et al., 2007). Также надо помнить, что ЭСК при культивировании могут подвергаться

генным и эпигенетическим изменениям, ведущим к трансформации клеточной культуры, хотя последнее может быть предотвращено технологическими протоколами культивирования (Shiras A. et al., 2007). После введения ЭСК во взрослые ткани для предотвращения их отторжения может потребоваться иммуносупрессивная терапия (Nussbaum J. et al., 2007). Эти факторы резко ограничивают энтузиазм по широкому внедрению в клиническую практику использования ЭСК в лечении повреждения спинного мозга и нервной ткани, несмотря на тот факт, что ЭСК обладают самым могучим потенциалом и могли бы широко применяться в репаративных клеточных технологиях. Альтернативой ЭСК служат СК, полученные из тканей сразу после рождения. Например, нейральные прогениторные клетки, полученные из взрослого головного мозга (Lois C., Alvarez-Buylla A., 1993; Uchida N. et al., 2000) и спинного мозга (Mayer-Proschel M. et al., 1997). Однако, надо заметить, что в данном способе получения большое количество нерешённых юридических и этических вопросов и, помимо этого, взрослые СК являются менее пластичными, чем ЭСК а скорость и частота их деления в культуре намного ниже по сравнению с ЭСК (Doetsch F. et al., 1999). Также определено, что их дифференцировочный потенциал уменьшается во времени (Wright L.S. et al., 2006). Эти параметры делают их возможным, но крайне ограниченным альтернативным источником для ЭСК в лечении поражения спинного мозга и нервной ткани. Конечно, если посмотреть с другой стороны, то у данных клеток есть свои преимущества – они могут быть трансплантированы без иммуносупрессии и культура не будет иметь генетических отклонений. При введении взрослых СК полученных от пациента не возникает иммунного отторжения (Gorin N.C. et al., 2002). Также при культивировании у взрослых СК, как правило, не возникает генетических отклонений, т.е. они имеют высокую степень геномной стабильности (Vats A. et al., 2005) и после введения не проявляют туморогенную активность (Foroni C. et al., 2007). Ну и, наконец, имеется лишь незначительный круг морально-этических вопросов в отношении применения взрослых СК, так как они получатся от самого пациента. Это и является решающим моментом в использовании взрослых СК, нежели ЭСК, в восстановлении центральной нервной системы. Это в определённой степени верная стратегия если удастся решить проблемы с низкой пластичностью и пролиферативным потенциалом взрослых СК по сравнению с ЭСК.

Один из краеугольных вопросов, стоящих как непреодолимая стена в отношении использования ЭСК, - это «Где та временная точка когда эмбрион считается человеком?» (Goldenring J.M., 1985; Peterfy A., 1995; Robertson J.A., 1999). В соответствии с Романской Католической Церковью и другими религиозными институтами эмбрион «должен лечиться как живой человек» (Roman Catholic Church, 1994). С этой точки зрения подразумевается, что бластоциста не может использоваться как источник клеток. Другие считают, что эмбрион является человеком только после 20 недели гестации (Goldenring J.M., 1985; Peterfy A., 1995), таким образом подразумевая, что клетки можно получать из бластоцисты. При данном взгляде подразумевается, что клетки могут быть получены из эмбриона, который был создан для искусственной фертилизации in vitro, но не использовался для поставленных целей. Другими словами он должен пройти процесс утилизации. Дискуссии на тему «жизнь», и когда «жизнь начинается», очень часто эксплуатируются для решения политических и религиозных вопросов. Продолжать дискутировать на эти темы могут только те люди, которые не встречались в своей семье с тяжёлыми болезнями, и не видели своих близких в неизлечимом состоянии. Нам, врачам, приходиться постоянно сталкиваться с вопросами жизни и смерти, и помощи пациентам. Поэтому, с нашей точки зрения долг врача помогать пациенту излечиваться от болезней или по крайней мере облегчать его страдания. Этот постулат не является призывом к неконтролируемым исследованиям. Наоборот, это призыв к врачам, чтобы они больше думали над тем, как помочь своему пациенту, и не поддаваться демагогическим сентенциям дилетантов от медицины.

В последние годы появился повышенный интерес к undyuu- poванным nniopunomenthum CK (на английской аббревиатуре (iPS)»). Получают iPS с помощью репрограммирования дифференцированных клеток, таких как dudof dudof

4), SOX2, KLF4 и MYC (Park I.H. et al., 2008; Takahashi K., Yamanaka S., 2006). Технология была подробно описана японскими учёными Takahashi и Yamanaka для мышиных фибробластов и теперь применяется для других мышиных клеток (Okita K. et al., 2007) и для человеческих соматических клеток (Yu J. et al., 2007). Из описанных выше четырёх транскрипционных факторов MYC и KLF4 могут быть спокойно заменены другими факторами (Yu J. et al., 2007). Механизмы, которые лежат в основе данной методики и приводят к репрограммированию, остаются до конца не изученными и весьма дискутабельными. В настоящее время все ещё не понятно насколько схожи *iPS* с настоящими ЭСК, и в какой области может быть получен схожий эффект и результат аналогичный применению ЭСК. Сейчас проводится сравнительное изучение генной экспрессии человеческих ЭСК и iPS (Lowry W.E. et al., 2008). Необходимо преодолеть несколько препятствий до того момента как *iPS*-клетки попадут в клинику. Это – использование ретровирусного вектора для введения транскрипционного фактора, необходимость селекционных маркеров для идентификации репрограммированных клеток. Хорошо известны онкогенные свойства МУС и интеграция ретровирусного вектора в геном. Эти необходимые требования для репрограммирования, но они изменяют клеточный геном и клеточную форму, что создаёт препятствие для терапевтического использования. Тем не менее, очевидно, что технологии с использованием iPS-клеток являются многообещающими с широкими перспективами в клинике без как либо моральноэтических проблем, которые сопровождают использование ЭСК.

Резюме

СК содержат в себе колоссальный потенциал для восстановления повреждений спинного мозга и нервной системы, в частности, но понять широту это потенциала в настоящее время не представляется возможным. В тоже время КТ в лечении повреждений нервной системы сейчас находятся только на самом начальном этапе своего развития и, конечно, невозможно чисто гипотетически и теоретически оценить как отрицательные моменты в виде осложнений, так и положительные моменты в виде

исцелений. Когда пациент становится инвалидом, или болезнь угрожает его жизни, то все сложившиеся морально-этические барьеры не должны стоять непреодолимой стеной перед врачами для помощи конкретному пациенту. Однако, надо понимать, что нельзя постоянно перешагивать через устоявшиеся морально-этические взгляды и грубо отрицать их. Необходимо, чтобы исследования и научные данные в области КТ шли намного быстрее и опережали демагогические дебаты на этические темы. Следовательно, для продолжения дальнейших исследований в области использования СК и КТ для терапевтических целей в лечении больных с поражением спинного мозга и нервной системы, все вопросы, связанные с данным направлением, надо решать уже сейчас.

Глава VII

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И ПОВРЕЖДЕНИЯ КОЖИ

Развитие тканевой инженерии кожи необходимо для дальнейшего широкого клинического применения в лечении кожных и системных заболеваний. В этом разделе мы рассматриваем использование эпидермальных СК как источника клеток для создания кожных трансплантатов. Применение СК, как основного материала для создания биокожи, имеет огромный потенциал, который позволит улучшить исходы болезней и лечение обширных раневых дефектов.

Проблемы в использование биокожи появилась после неудовлетворительных результатов лечения аутотрансплантатами, даже после успешного первоначального приживления (Meuli M., Raghunath M., 1997). Исследования показали, что успех создании биокожи зависит от выбора подходящей клеточной культуры, чтобы получить у пациента постоянную и функционирующую кожную ткань (Bianco P., Robey P.G., 2001). Долгосрочное функционирование пересаженной биокожи ограничено отсуствием достаточного количества эпидермальных СК, которые утрачиваются в результате культуральных работ. Решение вопроса о потере популяции СК во время культивирования матерала для биокожи - первостепенная задача для решения. Несколько исследований продемонстрировали преимущество прогениторных клеток над более дифференцированными кератиноцитами в создании биокожи кожи (Dunnwald M. et al., 2001; Pellegrini G. et al., 1999). Кератиноциты, выделяются благодаря специальной метке BrdU, от популяций СК и амплифицированных клеток, которые вместе с СК и в комбинации с І типом коллагена используются в создании биокожи. Обе популяции формируют эпидерму, но после 2 месяцев – только полученная из СК биокожа поддерживала нормальную эпидерму, в то время как эпидерма, сформированная из амплифицированных клеток, полностью дифференцировалась (Dunnwald M. et al., 2001).

Изучаются относительные вклады фолликулярных и межфолликулярных СК в поддержке эпидермиса и восстановлении раневой поверхности. Недавние исследования (Langton A.K. et 94

al., 2008) направлены на изучение роли СК полученных из луковицы волосяного фолликула в заживлении раны кожи. В этих исследованиях была использована модель животных, у которых полностью отсутствует луковица волосяного фолликула и не формируется первичная волосяная плакода. На этой модели была получена задержка в реэпителизации раны по сравнению с контрольной группой здоровых животных, и расширенная область межфолликулярной эпидермы, как компенсаторная мера, чтобы достичь закрытия и преобразования эпидермального барьера, что доказало важную роль фолликулярных и межфолликулярных СК в репарации раны (Langton A.K. et al., 2008). Было проведено изучение роли кератиноцитов в репарации кожных ран, в результате которого установлено, что фолликулярный эпителий способствует начальному закрытию раны, и фолликулярные клетки остаются в базальном слое эпидермы несколько месяцев спустя (Levy V. et al., 2007). Эти независимые исследовании показали, СК фолликула волосяной луковицы отвечают первыми и быстро на эпидермальное повреждение и способствуют восстановлению эпидермиса вместе с межфолликулярным кератиноцитами. Доказано, что для адекватных культуральных работ по сохранению в биокоже СК необходимо использовать аутографты, покрытые фибрином (Pellegrini G. et al., 1999). Тогда культуры поддерживают высокую клонногенность, темп роста для быстрого увеличения объёма биоткани. Дальнейшая проблема с разработкой биокожи – не естественное проявление биокожи, даже если она успешно прижилась. Кожа состоит из многих типов клеток, помимо *кератиноцитов* и *фибробластов*. Есть нервы, сальные железы, потовые железы, меланоциты, клетки Меркеля, и т.д. Более сложная реконструкция с волосяными фолликулами, меланоцитами, клетками сальных желёз может, очевидно, привести к созданию косметически и функционально нормальной кожи.

Эпидермальные СК представляют многообещающий источник для регенерации кожных покровов. Однако, несмотря на их самообновление и мультипотенцию, необходимо определить маркеры для эффективной изоляции эпидермальных СК. Если в настоящее время существуют специальные маркеры для изоляции ГСК, то для эпидермальных СК они ещё не найдены.

Предложены различные методы, чтобы изолировать эпидермальные СК, в частности — $\alpha 6$ -bright/CD71 — выделение кератиноцитов (Li A. et al., 1998; Terunuma A. et al., 2007); — быстрое прилипание клеток к коллагену IV типа (Bickenbach J.R., Chism E., 1998); — DNA метод (Kiel M.J. et al., 2007); и — использование флуоресцентного красителя на Hoechst 33342 (Triel C. et al., 2004). Комбинация в сильной экспрессии белка $\alpha 6$ uнтегрина ($\alpha 6$ bri) и слабой экспрессии CD71dim является, возможно, наиболее принятыми маркерами эпидермальных СК в настоящее время (Tani H. et al., 2000). Показано, что в человеческой коже $\alpha 6$ briCD71dim популяция клеток, содержит маленькие клетки с высоким уровнем ядерно-цитоплазматического отношения, способного к производству большого количества крупных колоний после 10 дней культуры. Проверка регенеративной способности $\alpha 6$ briCD71dim кератиноцитов показала, что у эквивалентов кожи, произведённых из этих клеток, была стратифицированная и толстая эпидерма, в то время как эквиваленты кожи от $\alpha 6$ briCD71bri клеток воспроизвели тонкий и плохо дифференцированный эпидермис (Kim D.S. et al., 2004).

На генную терапию в настоящее время возлагаются большие надежды по созданию клеток, способных производить большое количество новых клеток. В эпидермисе человека большинство клеток заменяется каждые 26–28 дней, и поэтому любая постоянная генетическая коррекция должно быть нацелена на популяции СК (Bickenbach J.R., Dunnwald M., 2000). Работы по исследованию прямого переноса генов в кожу не привели к постоянной и стабильной экспрессии генов. Прямая передача генов в кожу с помощью вирусных и невирусных векторов приводит к экспрессии генов, но только кратковременно и с низким уровнем (Jensen T.G., 2007). Недавнее исследование сообщило об успехе в долгосрочной человеческой регенерации кожи от одной единственной генетически модифицированной СК. В этой работе человеческие *кератиноциты* были преобразованы ретровирусным *GFP* вектором. Далее были отобраны популяции клеток с высокой клонногенностью и темпом роста. Эквиваленты кожи, полученные от этих популяций, показали нормальную эпидермальную архитектуру, подобную родной человеческой

коже (Larcher F. et al., 2007). Предполагается, что это может быть приемлемым подходом для создания биокожи.

Недавно стали доступны новые источники *мультипотентных* СК, которые могут использоваться как в создании эпидермальный компонент биокожи, так и улучшать функциональность кожного компонента.

Один из источников *мультипотентных эпидермальных* СК – это репрограммированные соматические клетки, или *индуцированные плюрипотентные стволовые клетки – iPS*. Успешно получены от взрослых человеческих кожных фибробластов трансдукцией *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* и с-Мус, клетки со свойствами *плюрипотентных*. Они были неотличимы от ЭСК в морфологии, быстром увеличении, поверхностных антигенах, экспрессии гена, плюрипотентности и теломеразной активности, и были также способны к производству компетентных зародышевой линией химер (Takahashi K., Yamanaka S., 2006).

Комбинация гемопоэтических и мезенхимальных прогениторов использована у пациентов с незаживающими хроническими язвами (Badiavas E.V., Falanga V., 2003) так же как и МСК, или субпопуляция с сосудисто-эндотелиальным фенотипом. Полученные из костного мозга СК имеют необходимую пластичность и способны к регенерации кровеносных сосудов, скелетного мускулатуры и миокарда (Ferrari G. et al., 1998; Kocher A.A. et al., 2001; Orlic D. et al., 2001). Полученные из костного мозга СК использовались в лечении хронических ран. Опубликованы клинические результаты использования аутологичных клеток костного мозга, которые непосредственно наносились на трофические язвы у 3 пациентов, которые не отвечали на стандартное традиционное лечение больше 1 года. У всех пациентов отмечено улучшение ран в течение нескольких дней после применения, которое характеризовалось устойчивым полным уменьшением в размере раны, увеличением васкулярности кожи и кожной толщины основания раны (Badiavas E.V., Falanga V., 2003). В то время как новые клетки кожи не окрашивались маркерами для ГСК, некоторыми маркерами для эндотелиальных клеток, и считалось, что клетками, ответственными за эту пластичность, были главным образом МСК. Таким образом,

костный мозг может быть важным источником плюрипотентных СК для биокожи.

Наконец, в периферической крови, содержатся клетки, полученные из костного мозга, которые называют фиброциты, которые мигрируют к месту повреждения тканей (Abe R. et al., 2001). Эти, полученные из костного мозга, мезенхимальные прогениторы, систематически обнаруживают в периферической крови больных ожогом (Bellini A., Mattoli S., 2007). Фиброциты и МСК как по отдельности, так и совместно могут потенциально использоваться в создании биокожи.

Резюме

В заключение надо отметить, что до создания полноценной биокожи как в косметическом, так и функциональном плане необходимо провести ещё много научно-исследовательских работ. Выбор подходящих клеток, чистота эпидермальной популяции СК, соответствующие условия культивирования – это факторы, важные для длительного приживления и функционирования восстановленной кожи. Кроме того, вероятно, что биокожа будущего будет включать более сложную реконструкцию, используя сначала эпидермальные СК для создания эпидермального компонента, наряду с добавлением СК от других подходящих тканевых линий (например, меланоциты). При создании биокожи вероятно, что эндотелиальные, мезенхимальные, нервные и/или другие примитивные СК могут помочь с созданием дермальных компонентов, включая новую сосудистую сеть. Такая конструкция должна позволить коже выполнять большинство своих нормальных функций: формирование барьера, пигментную защиту против ультрафиолетового облучения, терморегуляцию, а так же механическую и эстетическую функции (Metcalfe A.D., Ferguson M.W., 2007). Кроме того, важно научиться изолировать эпидермальные СК на уровне единственной клетки, чтобы лучше определить их характеристики, а также научиться управлять ими для использования в разработке достаточного количества ткани и многих других терапевтических направлений.

Глава VIII

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ МЕДИЦИНЕ

8.1. Клеточные технологии при метаболических нарушениях

В данном разделе представлены результаты наблюдения за группой пациентов с нарушением метаболических процессов, в лечении которых применялись КТ и проведено сравнение с группой пациентов с такой же патологией, но без применения КТ

Подагра – клинический синдром, который характеризуется развитием артритов, связанных с отложением в тканях сустава мононатриевых уратных кристаллов. Данные отложения связаны с изменением метаболизма мочевой кислоты, которые возникают при наличии генетических дефектов и под внешнесредовыми воздействиями, что в совокупности формирует каскад порочных метаболических реакций в организме пациента (Li E.K., 2004). В США при построении экономической модели для подагры показала, что ежегодные затраты на новые случаи заболевания составляют свыше 27 млн долларов (Kim K.Y. et al., 2003). Длительно протекающая бессимптомная картина проявляется резкой манифестацией в виде подагрической атаки. Через некоторое время атаки учащаются и пациенты в молодом возрасте становятся хронически больными (Schlesinger N., 2004). Проводимое лечение с помощью нестероидных противовоспалительных препаратов, аллопуринола, колхицина приносит кратковременное облегчение до следующей атаки. Ранее мы демонстрировали эффективность применения КТ у пациента с подагрой (Хадарцев А.А., Иванов Д.В., 2006).

Основная группа пациентов (мужчины) состояла из 9 человек со средним возрастом 49,2±4,4 года с диагностированной подагрой в течение 8,1±3,3 лет. Регулярно принимающие аллопуринол, при возникновении выраженного болевого синдрома добавляющие в терапию нестероидные противовоспалительные средства. До проведения терапии с использованием КТ имелись боли в крупных суставах (коленных, локтевых). Всем пациентам

применялись аутологичные клетки, полученные из костного мозга. Контрольная группа пациентов, также включала мужчин в количестве 9 человек совпадающие по возрасту $48,6\pm3,5$ и длительности заболевания $9,1\pm3,2$ года и лекарственной терапии с основной группой.

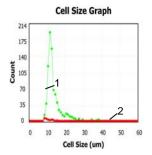
Для формирования основной группы существовали следующие *критерии включения*:

- заболевание подагрой, сопровождающиеся поражением крупных суставов;
 - возраст старше 45 лет;
- добровольное согласие больного на участие в исследовании:
 - способность больного заполнить опросник.

Критерии исключения:

- отказ больного от участия в исследовании;
- непонимание больным цели исследования;
- наличие тяжёлых сопутствующих заболеваний, симптоматика которых доминирует над проявлениями основного заболевания.

После обследования и отсутствия противопоказаний у основной группы производился забор аспирата костномозговой взвеси из гребня подвздошной кости в количестве 150 мл. На градиенте фиколла выполнено выделение мононуклеарных клеток. Культивирование клеток проводилось в среде *Iscov* («Sigma») с добавлением FBS 10% («HyClone»). На третьи сутки культивирования неприкрепившиеся клетки (300 ±80 млн) были отмыты от компонентов среды и разделены на 2 равные части, одна из которых была введена внутривенно капельно, вторая была криоконсервирована. Повторное введение криконсервированных клеток проводилось через 30 дней после первого введения, размораживание криконсервированных клеток проводилось непосредственно перед их введением в асептических условиях. Жизнеспособность и подсчёт клеток проводились с помощью автоматического счётчика $Countess^{TM}$ (фирма INVITROGEN, США). Результаты представлены в виде графика и изображения на рис. 1.



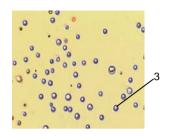


Рис. 1. Результат тестирования клеток: 1 – живые клетки,
 2 – нежизнеспособные, 3 – клетки окрашены трипановым синим,
 живые клетки не поглощают данный краситель.
 По вертикали количество, по горизонтали размер

Рентгенография плюснефаланговых, коленных и локтевых суставов проводилась до терапии и через 12 месяцев после неё. Контрольные точки обследования -1, 3, 6 и 12 месяцев после введения *аутологичных клеток*. Пациенты основной и контрольной групп сдавали биохимический анализ крови, общий анализ мочи, заполняли стандартизированные опросники SF-36, EQ-5D.

Перед введением *аутологичных клеток* пациентам обязательно проводилось исследование клеточного состава методом проточной цитофлуориметрии. Результаты представлены в табл. 9.

Таблица 9

Иммунофенотип использованной аутологичной
костномозговой взвеси

Маркер	CD	CD	CD	CD 19	CD 20	CD 22	CD 23	CD 34	CD	CD	HLA-
	3	5	7						38	71	DR
Резуль-	38,6±	44,6±	36,6±	5,1±	2,5±	1,4±	1,4±	1,2±	15,1±	12,5±	6,9±
тат	3,7	4,2	2,8	0,5	0,3	0,3	0,2	0,2	2	3,4	1,7

При обработке опросника *SF-36* результаты представляются в виде оценок в баллах по 8 шкалам, составленных таким образом, что более высокая оценка указывает на более высокий уровень КЖ. Шкалы группируются в два показателя: «Физический компонент здоровья» (РН) и «Психологический компонент здоровья» (МН). Данные по результатам опросника *SF-36* основной и контрольной групп представлены в табл. 10.

Таблица 10 Данные по опроснику SF-36

Сроки\Группы	Осн	овная	Контрольная		
Сроким руппы	PH	MH	PH	MH	
До введения	39,08±3,45	36,96±2,12	38,06±5,06	39,18±4,25	
Через 1 месяц	52,46±2,4	52,62±3,27	38,06±5,06	39,04±2,02	
3 месяца	45,18±1,43	56,52±1,28	39,08±2,12	40,08±3,02	
6 месяцев	48,13±2,17	54,95±1,03	41,14±4,25	42,07±1,3	
12 месяцев	49,08±3,47	59,03±5,45	40,04±1,23	40,08±1,42	

Оценка полученных данных происходит достаточно простым способом: чем ближе показатель к 100, тем лучше состояние здоровья. Обращает на себя внимание, что наилучший показатель физического компонента здоровья был через месяц после проведения терапии с использованием аутологичных клеток. В контрольной группе изменений в оценке собственного состояния здоровья не происходило. В дальнейшем физический компонент стабилизировался и немного снизился, продолжая оставаться неизменным в течение более 6 месяцев у пациентов основной группы. Клиническая картина болезни у пациентов основной группы кардинально изменилась, что отмечено практически у всех пациентов, в течение первого месяца. Если раньше погрешности в диете (алкоголь, белковая пища – мясо в больших количествах) вызывали резкий болевой синдром не только в мелких, но и крупных суставах, с отёком и местами гиперемией, тугоподвижностью и болями, то после терапии болевой син-дром локализовался в области 1–2 плюснефаланговых суставов. Боли в крупных суставов практически исчезли. При этом необходимо отметить, что пациенты кардинально не изменяли свой образ жизни, погрешности в диете происходили достаточно регулярно, но количество таблетированных препаратов резко уменьшилось. Снижение составило от 10 до 20% от ранее принимаемых количеств. В основном болевой синдром купировался только диетой. Анализ первой части опросника EQ-5D подтвердил данные, полученные при помощи опросника SF-36. Данные обработки опросника EQ-5D представлены в табл. 11. Различие заключается в числовом значении, в EQ-5D, чем ближе к 1,00 показатели, тем выше оценка здоровья пациентом. В данном опроснике также отмечена тенденция к улучшению через 1 месяц, которая стабилизировалась на весь период наблюдения, т.е. более 12 месяцев.

Таблица 11

Результаты по	опроснику	EQ-5D
---------------	-----------	-------

Сроки∖	Осно	вная	Контр	ольная
Группы	Индекс «градусник»		Индекс	«градусник»
До введения	$0,708\pm0,03$	60±8	$0,658\pm0,02$	60±2
Через 1 месяц	$0,811\pm0,03$	80±4	$0,688\pm0,07$	60±3
3 месяца	$0,824\pm0,02$	80±8	$0,688\pm0,03$	60±3
6 месяцев	$0,82\pm0,04$	78±6	$0,682\pm0,05$	61±4
12 месяцев	$0,798\pm0,02$	76±8	$0,658\pm0,07$	58±6

Более наглядно представлена собственная визуальная оценка здоровья пациента. Отмечено значительное улучшение у основной группы на 10–30% через месяц по сравнению с периодом до терапии и впоследствии снижение и стабилизация. При сравнении результатов, полученных при обработке всех опросников, отмечено, что даже через год после проведения терапии пациенты основной группы не достигли по оценке своего здоровья (как интегрального показателя) значений, которыми они характеризовали собственное качество жизни до терапии. В течение наблюдаемого промежутка времени пациенты основной группы не имели госпитализаций в стационар для лечения, хотя в последние годы перед проведением терапии госпитализирова-

лись с определённой периодичностью, составляющей не менее 1–2 раз в год. В контрольной группе были госпитализации во время периода наблюдения.

В анализах пациентов, которые выполнялись в контрольных точках (до терапии, через 1, 3, 6, 12 месяцев) происходили колебания показателей функции печени, азотистого обмена, липопротеидов, ревматологических проб табл. 12.

Таблица 12 Усредненные данные основной группы пациентов

Показатели	До введе-	Через 1	Через 3	Через 6	Через 12
(норма)	ния клеток	месяц	месяца	месяцев	месяцев
АлАТ $(N = 8-54)$	31	45	20	57	48
AcAT (N = 7-38)	18	30	15	40	35
Креатинин (N=53-142)	117,2	135	68	94	130
Мочевина (N = 3-6,8)	9,3	7,2	6,6	8,0	7,4
Холестерин (N=3,27-6,2)	6,4	6,0	6,8	7,0	6,2
ЛПНП $(N = 0-4,7)$	4,39	4,0	4,5	4,2	5,2
ЛПВП (N = $0.8-2.3$)	0,9	1,5	1,8	1,2	1,0
СОЭ(Ы =2-10)	9	5	3	6	8
Мочевая кислота (3,4-7,0)	9,3	7,4	7,2	8,4	7,8
Мочевая кислота в суточной моче (2,4-5,9)	1,7	3,2	4,0	2,0	2,5

Отмечается, что ухудшение биохимических показателей было связано с погрешностями в диете перед исследованиями, что достаточно быстро компенсировалось диетой, и повторные анализы приближались к норме.

Резюме

Первое классическое описание подагрического артрита «Трактат о подагре» принадлежит крупнейшему английскому клиницисту XVII века Th. Sydenham, который сравнивал боль при подагре с болями «от зажима конечности прессом».

Позднее Yarrod (1883) с помощью нитки, опущенной в кровь больного подагрой, открыл факт повышения содержания в крови мочевой кислоты. В 1899 г. были обнаружены кристаллы уратов в суставной жидкости во время приступа подагрического артрита, но лишь в 1961 г. MacCarty и Hollander установили роль кристаллов уратов в развитии подагрического воспаления.

Принято отсчитывать начало подагры с первого приступа артрита, который знаменует начало интермиттирующей подагры. Для неё характерно чередование острых атак и ремиссий; во время последних человек чувствует себя совершенно здоровым. Между первым и повторными приступами может пройти несколько лет, но чаще они повторяются 1–2 раза в год. С течением заболевания «светлые промежутки» между атаками сокращаются.

В типичных случаях (50–65%) поражается I плюснефаланговый сустав с развитием острого моноартрита. Характерная локализация подагры, возможно, обусловлена тем, что именно в этих суставах раньше и чаще всего возникают дегенеративнодистрофические изменения хряща, что предрасполагает к отложению уратов. У 15–20% подагра дебютирует с поражения других суставов ног: II–IV плюснефаланговых, голеностопного, коленного и, как исключение, суставов рук (отсюда и название болезни, которое в переводе с греческого означает «капкан для ноги» — podos — стопа, нога; argo — капкан). В 5% случаев наблюдается полиартикулярное начало заболевания.

Клиническая картина развивается в результате кристаллизации мочевой кислоты в полости сустава. Выпавшие кристаллы фагоцитируются нейтрофилами синовиальной жидкости. При этом повреждаются сами нейтрофилы. Освобождаются лизосомные ферменты, которые и запускают воспалительный процесс. Накопление в синовиальной жидкости сустава мочевой кислоты происходит из-за большого количества синтеза мочевой кислоты, а точнее нарушения процессов обмена пуриновых оснований в печени. Нарушение вывода мочевой кислоты через почки является вторичным механизмом, поэтому основное внимание приковывается к синтезу в печени. Именно в ней оксипурины (гипоксантин и ксантин) под действием фермента ксантиноксидазы превращаются в мочевую кислоту. Патогенные факторы (алкоголь, жировая дистрофия печени, сахарный диабет, переедание продуктов, содержащих пуриновые основания и т.п.) нарушающие синтетические процессы в печени, естественно влияют на обмен мочевой кислоты. Конечно, все это накладывается на имеющиеся генетические дефекты, которые играют немаловажную роль в развитии заболевания.

маловажную роль в развитии заболевания.
Получение аутологичных гемопоэтических клеток, последующие культуральные работы с ними и большое содержание их в вводимой суспензии и обусловили получение положительных результатов у пациентов. Происходит это по нескольким причинам. Во-первых, сама процедура забора аспирата костномозговой взвеси является стрессовым фактором для организма, который моментально реагирует через систему аутокринных и паракринных механизмов на обменные процессы. Происходит это благодаря эндогенным иммуномодуляторам к которым относятся интерлейкины. Многочисленные эффекты иммуномодуляторов объясняются тем, что их рецепторы обнаруживаются на подавляющем большинстве различных типов клеток. Связывание иммуномодулятора с рецептором приводит к экспрессии генов и последующему синтезу молекул, соответствующих «репертуару» данного типа клеток. В настоящее время хорошо известно, что цитокины, к которым относятся и интерлейкины, являются ключевыми факторами, регулирующими активность нейронов ЦНС, проницаемость сосудов, уровень острофазовых белков. Все цитокины, а их в настоящее время известно более 30, по структурным особенностям и биологическому действию делятся на несколько самостоятельных групп. Группировка цитокинов по механизму действия позволяет разделить цитокины на следующие группы:

- провоспалительные, обеспечивающие мобилизацию воспалительного ответа (интерлейкины 1,2,6,8, $\Phi HO\alpha$, интерферон γ);
- противовоспалительные, ограничивающие развитие воспаления (интерлейкины 4,10, $TGF\beta$);

• регуляторы клеточного и гуморального иммунитета — (естественного или специфического), обладающие собственными эффекторными функциями (противовирусными, цитотоксическими). Спектры биологических активностей цитокинов в значительной степени перекрываются: один и тот же процесс может стимулироваться в клетке более чем одним цитокином. Во многих случаях в действиях цитокинов наблюдается синергизм. Цитокины активны в очень малых концентрациях. Образование и секреция

чаях в действиях цитокинов наблюдается синергизм. Цитокины активны в очень малых концентрациях. Образование и секреция цитокинов происходит кратковременно и строго регулируется.

Второй механизм после введения аутологичных гемопоэтических клеток при лечении подагры — это коррекция синтетических процессов в самой печени. В перипортальной зоне, где находятся желчный проток, ветвь печёночной артерии и ветвь воротной вены, располагаются овальные клетки. Овальные клетки считаются предшественниками гепатоцитов и холангиоцитов. Для овальных клеток характерно экспрессия маркеров, также как и для гемопоэтических клеток, в частности СD34+. Это не случайно, потому что на определённом этапе развития, с 10 по 18 неделю, печень функционирует как гемопоэтический орган (Кіпоshіtа Т., Міуајіта А., 2002). Естественно, что вновь введённые культивированные аутологичные клетки устремятся в печень, где часть их останется, часть клеток возвращается в свои ниши, т.е. в костный мозг. Клетки, которые попадают в печень и остаются там, благодаря доказанному эффекту хоуминга (от англ. слова «home» — дом) активизируют работу овальных клеток и гепатоцитов 1 порядка, локализующихся ближе всего к перипортальной области, обеспечивая активные процессы микросомального и пероксисомального окисления. Пероксисомы являются специализированными окислительными органеллами гепатоцитов. В них содержится окидаза мочевой кислоты, которая необходима для метаболизма последней. Изменение синтетических процессов в гепатоцитах первого порядка процеходит за счёт каскада реакций, возникающих в результате выброса цитокинов ГСК и клетками моноцитарно-макрофагальной линии. Экспрессия цитокинов и ростовых факторов данными клетками происходит в нанодозировках и за нанопериоды. Отсутствие необходимого инструментария (оборудования, методов, методик) не позволяет оценить суммарный пул каскадных изменений, которые происходят у пациента. Получаемые стан-

дартные биохимические анализы в рутинной клинической пракдартные опохимические анализы в рутинной клинической практике слабо отражают изменения на тонком клеточном уровне. Однако при отслеживании динамики развития заболевания у основной группы пациентов мы обратили внимание на достоверное улучшение интегрального показателя функционирования организма, который выражается как КЖ. В контрольной группе пациентов таких значительных изменений не происходит.

Стандартные методики лечения пациентов с хронически протекающей подагрой с применением ингибиторов ксантиноксидазы (аллопуринол) и ингибиторов простагландинов (нестероидных противовоспалительных средств) со временем теряют свою эффективность. В данном разделе представлен положительный результат применения КТ в лечении пациентов с подагрой.

8.2. Гиперлипидемия и применение клеточных технологий

При применении КТ у пациентов с различными заболеваниями печени (чаще невирусного поражения), сердечно-сосудистыми заболеваниями и сахарными диабетом мы обратили внимание, что у пациентов с высоким содержанием в периферической крови липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП), триглицеридов (Тг), холестерина (ХС), через определённое время происходили процессы стабилизации данных показателей. В результате в данную группу вошли 54 пациента, из которых женщин было 9 человек, соответственно 45 мужчин. Средний возраст составил 54,2±6,1 лет. Распределение пациентов по группам представлено в табл. 13.

Таблииа 13

Распределение	пациентов	ПО	группам
---------------	-----------	----	---------

	Ауто	Алло
Мужчины	2	43
Женщины	3	6
Возраст (год)	52,3±2,1	55,4±1,4
количество	5	49

Примечание: Ауто – пациенты, у которых использовались аутологичные клетки; Алло – пациенты, которым применялись аллогенные клетки

Методы введения — 49 пациентам проводилось введение аллогенных (фетальных) клеток в дозе 100 млн. Введение проводилось системное (внутривенное) под контролем основных витальных функций, 5 пациентам внутривенно вводились аутологичные клетки, получение которых производилось с помощью пункций костей таза и последующими культуральными работами. Количество введённых аутологичных клеток было не менее 120 млн. Осложнений при заборе клеток и после введения отмечено не было. Все пациенты подписали информированное согласие на применение клеточных технологий в лечении их болезней.

Тестирование пациентов проводилось через месяц после первичного введения клеток как *аллогенных* (фетальных), так и *аутологичных*. Данные изменений динамики липидного профиля крови представлены в табл. 14.

Таблица 14

Динамика изменения липидного профиля крови у пациентов

	Ауто			Алло				
	P0	P1	P2	P3	P0	P1	P2	P3
ЛПНП	6,2±0,6	5,9±0,4	5,8±0,3	5,8±0,2	6,3±0,6	5,8±0,5	5,2±0,6	5,1±0,2
ЛПОНП	1,1±0,2	1,1±0,1	$1,0\pm0,2$	$0,9\pm0,1$	1,1±0,2	$0,9\pm0,3$	$0,8\pm0,2$	0,7±0,1
ЛПВП	$0,6\pm0,15$	0,6±0,2	$0,7\pm0,2$	$0,8\pm0,2$	$0,6\pm0,1$	$1,1\pm0,2$	1,3±0,2	1,1±0,1
Τг	3,6±0,2	3,5±0,3	3,5±0,3	3,5±0,1	3,7±0,2	3,6±0,2	3,4±0,3	3,4±0,1
XC	8,2±1,1	8,0±0,9	7,9±0,8	$7,8\pm0,8$	8,3±1,2	$7,9\pm0,6$	6,7±0,5	6,6±0,2

Примечание: T_{Γ} – триглицериды; ЛПВП – липопротеиды высокой плотности; XC – холестерин

Было отмечено, что у всех пациентов происходило не только снижение уровня ЛПНП, холестерина, но и происходило повышение уровня *липопротеидов высокой плотности* (ЛПВП). В среднем снижение ЛПНП, Хс в течение первого месяца составляло около 15%, повышение ЛПВП не превышало 10%. В дальнейшем – группе пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями выполнялись повторные введения клеток, которые не по-

зволяют экстраполировать результаты на всех пациентов. Достоверно показано, что корректировка дислипидемии проходит в течение первого месяца и наиболее выражена была у пациентов с применением фетальных клеток, по сравнению с пациентами у которых применялись аутологичные клетки. После первичного однократного введения эффекты по снижению и нормализации дислипидемии продолжались в течение 3-ех месяцев. В дальнейшем происходила стабилизация процесса, в некоторых случаях отмечено повышение ЛПНП, ХС и снижение уровня ЛПВП.

Резюме

Метаболизм липопротеинов — это динамический процесс, включающий в себя как разнообразные перемещения липидов и апопротеинов между отдельными классами липопротеинов, так и целый ряд реакций, катализируемых ферментами. Эти взаимодействия приводят в том числе к рецептор- опосредованному поступлению XC в клетку или его удалению из клетки. Основное место отведено превращениям XC, который находится в плазме в относительно небольших количествах.

Клинический эффект объясняется органотропностью или хоумингом фетальных клеток, способностью их тканеспецифично заселять печень, нормализовать метаболизм ЛПОНП, ЛПНП и XC повреждённых клеток, а также способствовать восстановлению нормальной рецепции ЛП на поверхности гепатоцитов. Другой возможный механизм действия фетальных клеток – неспецифический. Введённые клетки, будучи малодифференцированными, с помощью биологически активных веществ (цитокины, факторы роста) активизируют собственные эндогенные механизмы регуляции восстановительных процессов в печени, путём регуляции дифференцировки клеток макрофагально-моноцитарного ряда и выделения ими собственных (эндогенных) регуляторных пептидов. Регуляторные свойства аллогенных СК могут быть воспроизведены аутологичными клетками костного мозга, в популяции которых присутствуют плюрипотентные клетки.

8.3. Клеточные технологии в спорте

Нами были поставлены следующие задачи:

- 1. Определить исходный уровень подготовки спортсменов к нагрузке на длительную физическую выносливость.
- 2. Подобрать наиболее оптимальный курс клеточной терапии направленный на улучшение устойчивости организма спортсмена к тренировочному стрессу.
- 3. Определить период максимального действия выбранной терапии.
- 4. Определить длительность действия выбранного курса терапии.
- 5. Определить результативность воздействия данного курса клеточной терапии на спортсменов по результатам диагностических тестов.
- 6. Оценить влияние выбранного курса клеточной терапии на изменения мышечной массы, объёма, силы.

Исследование проводилось на двух группах спортсменов, которые находились в режиме интенсивного тренинга. Первая группа – контрольная, в данной группе не применялись КТ, вторая группа – основная, применялись КТ. Возраст от 24 до 38 лет, средний возраст 32±4,3 года, имеющих тренировочный стаж не менее 5 лет. Уровень подготовки – высококвалифицированные спортсмены (ВКС). В основной группе разделили на 3 подгруппы:

- применялись только аллогенные клетки;
- применялись аллогенные и аутологичные;
- только аутологичные клетки.

Перед проведением терапии спортсмены прошли стандартизированные тесты, оценивающие их физическую подготовленность.

Контрольные точки, на которых проводилось тестирование: 14 дней, 1 месяц, 2 месяца. Мониторирование ВКС выполнялось каждые 48 часов.

Забор аспирата костномозговой взвеси проводился по отработанной методике за 14 дней до начала эксперимента. Введение клеток осуществлялось системно, через пункцию кубитальной вены под постоянным контролем витальных функций. Ос-

ложнений при заборе аспирата костномозговой взвеси и при введении клеток не было.

Результат выполнения тестов представлен в табл. 15. Данные суммируют 3 теста. Время восстановления после тестов показано в табл. 16. Изменение жировой ткани в табл. 17. Изменение активной клеточной массы в табл. 18.

Таблица 15 Суммарные результаты выполнения тестов

Месяц/группы	аллогенные	алло+ауто	аутологичные	контроль
Начало	121±2,5	126±1,8	120±2,2	115±2,1
14 дней	123±2,2	128±1,7	121±1,9	116±2,1
Через месяц	138±2,8	164±0,8	119±2,1	116±2,2
Через 2 месяца	147±3,1	189±0,6	122±2,1	117±2,2

Таблица 16
Время восстановления после выполнения тестов (в секундах)

Месяц/ группы	аллогенные	алло+ауто	аутологичные	контроль
Начало	35±2,5	30±2,5	20±2,5	20±2,5
14 дней	30±2,3	28±2,2	20±2,4	20±2,5
Через месяц	20±2,2	15±2,1	15±2,3	18±2,5
Через 2 месяца	10±2,2	10±2,1	13±2,4	15±2,5

Таблица 17

Изменение жировой ткани*

Месяц/ группы	аллогенные	алло+ауто	аутологичные	
Начало	6,7±0,5	$20,3\pm0,8$	15,9±0,5	
Через месяц	6,3±0,5	19,4±0,5	16,3±0,5	
Через 2 месяца	6,4±0,5	20±0,5	15,7±1,1	

Примечание: * – условные единицы

Таблица 18

Изменение активной клеточной массы*

Месяц/ группы	аллогенные	алло+ауто	аутологичные	
Начало	29,8±0,3	53,8±0,2	39,1±0,2	
Через месяц	31,2±0,1	52,5±0,2	37,7±0,2	
Через 2 месяца	30,1±0,4	53,0±0,1	39,3±0,3	

Примечание: * - условные единицы

Первичные эффекты в повышении работоспособности, выносливости, снижении периода восстановления отмечены у спортсменов ко второй неделе. Также обратило на себя внимание, что наиболее ярко они проявлялись у спортсменов где использовались аллогенные клетки. При сравнении результатов у ВКС разных возрастов отмечено, что более выраженные эффекты у спортсменов более старшего возраста. После повторного введения клеток, которое выполнялось через 1 месяц от первичного, субъективные ощущения у ВКС и результативность росла около 14 дней, после чего наступила стабилизация.

Выявить закономерность в изменениях активной мышечной массы или жировой ткани не удалось. Также не обнаружено изменений в лабораторных показателях табл. 19.

Таблица 19 Динамика изменений у спортсменов контрольной и основной групп в общем анализе крови

Показатель	Основная группа				Контрольная группа			
	P0	P1	P2	P3	P0	P1	P2	P3
Эр-ты	4,5±0,5	4,4±0,6	4,5±0,3	4,5±0,4	4,8±0,3	4,8±0,4	4,7±0,6	4,7±0,4
Гем-н	143±6,3	144±3,4	143±6,2	145±1,6	139±6,8	142±2,6	141±4,1	140±0,8
Лей-ты	6,2±1,4	6,5±1,3	6,6±1,1	6,4±1,3	6,8±2,4	6,4±2,1	6,5±1,4	6,6±0,6
СОЭ	8±3,2	8±3,5	8±2,9	8±2,8	5±1,2	6±2,2	6±0,2	6±0,5

Примечание: P0 – до применения клеточных технологий; P1 – через 14 дней; P2 – через 1 месяц; P3 – через 2 месяца

8.4. Клеточные технологии и качество жизни

В настоящее время в клинической практике для оценки результатов проведённого лечения существуют не только инструментальные, лабораторные и визуальные методы, но и интегральные показатели. Один из интегральных показателей результатов лечения больного является изменение его качества жизни. Качество жизни (КЖ) определяется как совокупная характеристика физического, психологического, эмоционального и социального функционирования больного, основанная на его субъективном восприятии. Определяется КЖ самим пациентом с помощью стандартизированных опросников. Математические модели, заложенные в опросники, позволяют чётко и достоверно оценить результаты проведённых методов лечения, что особенно важно при использовании новых технологий, в частности клеточных. Напомним, что КТ подразумевают под собой биомедицинские технологии с использованием различных видов клеток и клеточно-инженерных конструкций. Одними из первых исследований КЖ в клинической медицине были выполнены у больных с поражением сердечно-сосудистой системы. По результатам исследований стало ясно, что устоявшиеся подходы в интерпретации проведённого лечения, которые всецело опирались на лабораторные и инструментальные показатели, отражали только физическую составляющую больного. Они не давали возможности оценить и получить полного представления о жизненном благополучии пациента, которое включает, помимо физической составляющей, ещё и психологическое, эмоциональное, духовное и, наконец, крайне важное, социальное функционирование больного. Изучение КЖ у больных с поражением сердечно-сосудистой системы, благодаря новому подходу, позволяет раскрыть многоплановость болезни и даёт важную информацию об основных направлениях жизнедеятельности больного, в частности психологической, физической, социальной и т.д. Что касается КЖ, связанного со здоровьем, то оно включает компоненты, позволяющие провести дифференцированный анализ влияния болезни и, самое важное, лечения – на состояние больного. Полученные данные позволяют осуществлять постоянный мониторинг состояния больного и вовремя произвести

необходимую коррекцию. Важно, что сам пациент производит оценку своего здоровья, а это является ценным и надёжным показателем его общего состояния. Когда начинались работы по оценке КЖ у больных с поражением сердечно-сосудистой системы, перечень инструментов был крайне скудным и поэтому результаты зачастую были не совсем корректными. В настоящее время стандартизированные опросники характеризуются высокой степенью валидности, чувствительности и надёжности. Среди общих опросников, наиболее часто используемых в клинической практике для оценки качества жизни у пациентов с поражением сердечно-сосудистой системы, надо отметить следующие: SIP (Sickness Impact Profile), NHP (Nottingham Health Profile), SF-36 (Medical Qutcomes Stude 36 – Item Short Form heart survery), EQ-5D и т.п. Существует также большое количество специализированных опросников, которые применяются в том или ином разделе кардиологии. Назовём лишь некоторые из Hux SAQ (The Seattle Angina Questionnaire), CARDIAC (Ferrans and Powers Quality of Life Index), Quality of life Questionnaire in Severe Heart Failure и т.д. В одном крупномасштабном исследовании, которое проводил шведский университет в Гётеборге были изучены последствия в раннем и отдалённом послеоперационном периодах у больных с кардиохирургическими операциями. В протокол были включены 2121 больной. Исследование проводили с помощью опросников PAS, NHP, PGWBI, которые больные заполняли на нескольких точках – до выполнения операции, через 3 месяца, 1 и 2 года после операции. При обработке опросников было отмечено улучшение показателей по всем опросникам. В частности по опроснику PAS (Physical Activity Score), который характеризует физическое функционирование и наличие симптомов, постепенно уменьшался, что говорило об улучшении состояния больного. Суммарный индекс опросника NHP, характеризующий выраженность ограничений в физическом, социальном и ролевом функционировании снижался через 2 года после операции, что также говорит об улучшении параметров КЖ больного. Показатель благополучия по опроснику PGWBI (Psychological General Well-Being Index) имел положительную динамику в течение всего периода наблюдения. При проведении анализа через 2 года после операции позволил уста-

новить, что наиболее выраженное улучшение отмечается в показателях физического функционирования и боли, после которых следуют показатели психологического здоровья. Отмечено, что через 2 года после аортокоронарного шунтирования (АКШ) наиболее проблематичным было сексуальное функционирование, причём к факторам риска были отнесены мужской пол, сахарный диабет и предоперационные проблемы. В заключение данного исследования был сделан вывод о том, что АКШ существенно повышает уровень качества жизни больных. Заметное улучшение наблюдается уже через 3 месяца после операции, с последующим сохранением положительной динамики в течение улучшение наблюдается уже через 3 месяца после операции, с последующим сохранением положительной динамики в течение 2-х лет. В принципе концепция исследования КЖ имеет широкие возможности применения в кардиологии и позволяет оптимизировать проведение стандартизации методов лечения и обеспечить полноценный индивидуальный мониторинг состояния больного, а также осуществить экспертизу новых методов лечения, опираясь на международные критерии, принятые в большинстве развитых стран. Мировая статистика говорит о том, что поражение сердечно-сосудистой системы является основной причиной смертности населения в мире и поэтому улучшение качества жизни у больных с имемической болезнью сердца (ИБС) является самой важной задачей в лечении таких пациентов. Особенно интересным представляется сравнение различных методов лечения ИБС (хирургического, терапевтического, реабилитационных программ, сроков и режимов лечения). В проведённом в США исследовании изучали динамику показателей жизни у пожилых пациентов с ИБС, которым была выполнена ангиопластика коронарных сосудов. В исследовании использовались опросники SF-36 и SAQ. По полученным через 3 месяца после операции данным наблюдали отчётливую динамику улучшения показателей КЖ по большинству шкал обоих опросников. Был сделан вывод о том, что коронарная ангиопластика существенно улучшает качество жизни у больных с ИБС. В отношении АКШ также была выполнена работа в Кембриджском Университете, где с помощью опросника NHP было установлено, ито АКШ приволит к улучшению всех показателей КЖ ском Университете, где с помощью опросника *NHP* было установлено, что АКШ приводит к улучшению всех показателей КЖ и эти показатели через 2 года после операции в несколько раз превосходят предоперационные значения. Опросник использо-

вался до операции, через 3 и 12 месяцев после операции. Данные о КЖ, полученные до лечения, могут дать врачу ценную исходную информацию о динамике развития заболевания и его исходе, что поможет в выборе правильной программы лечения. Интегральный показатель — КЖ — как прогностический показатель может быть полезным при стратификации больных в клинических исследованиях и при выборе стратегии индивидуального лечения больного. При планировании операции АКШ клиного лечения оольного. При планировании операции АКШ клиницисты традиционно опираются на известные неблагоприятные факторы риска: повторная операция, тяжесть болезни, сопутствующая патология и т.п. Исследование КЖ позволяет получить дополнительную ценную информацию, наряду с другими клиническими методами. Таким образом, совокупность полученных данных позволит более точно предвидеть развитие лученных данных позволит более точно предвидеть развитие событий в послеоперационном периоде. Большая программа по оценке прогностического потенциала данных о КЖ при использовании хирургических методов лечения ИБС была реализована в США с 1992 по 1996 годы, когда в 14 клинических центрах для ветеранов провели исследования качества жизни, как прогностического фактора летальности после операции АКШ. В данное исследование было включено 4969 пациентов и использование обърматься обърматься в простокти после операции обърматься в после операции операции операции операции операции операции операции операции операци зовались опросники SF-36, которые они самостоятельно заполняли за 72 часа до операции. Было установлено, что показатели физического функционирования в дооперационном периоде являются независимым прогностическим фактором летальности после операции. Предварительные данные по шкалам психологического здоровья не имели достоверной корреляции с уровнем летальности. Этот факт стал неожиданным, т.к. считается, что депрессия является независимым фактором риска в развитии ИБС и играет роль при прогнозировании вероятности летального исхода. Разработка терапевтических и реабилитационных программ для больных, перенесших кардиохирургические операции, во многом опирается на данные о динамике их качества жизни в ранние и отдалённые сроки после операции. Большая работа была проведена по созданию специальных программ по реабилитации больных после АКШ и коронарной ангиопластики. В обзоре, который выполнил E.Cornell et al., посвящённом различным аспектам кардиохирургических операций, серьезное внимание уделено результатам исследования КЖ больных в периоде их реабилитации. Анализ исследований, в которых проведена оценка КЖ в динамике, показал необходимость комплексного подхода к реабилитации с целью компенсации всех нарушений, выявленных при исследовании КЖ, и неэффективность одностороннего подхода, когда используется только социальная или только психологическая поддержка.

Остановимся более подробно на некоторых опросниках. Опросник *SIP* включает 136 вопросов, отражающих 12 категорий КЖ. При расчетах полученных данных определяют значение каждой категории и интегральный показатель КЖ. Эта методика хорошо валидизирована для оценки КЖ больных с различными заболеваниями сердечно-сосудистой системы, однако не обладает достаточно высокой чувствительностью для характеристики динамики качества жизни таких пациентов под влиянием медикаментозного лечения.

Опросник SAQ. Болезнь-специфическая для ИБС анкета SAQ состоит из 19 вопросов, которые объединены в 5 шкал: физические ограничения, стабильность приступов, частота приступов, удовлетворенность лечением и отношение к болезни. При этом 100,00 баллов по каждой из шкал опросника SAQ соответствует наиболее высокому КЖ.

Опросник *NHP* состоит из 38 вопросов, включающих 6 категорий качества жизни, отражающих следующие аспекты: болевые ощущения, физические способности, сон, эмоциональные реакции, энергичность, социальная изоляция и 6 дополнительных разделов, отражающих влияние состояния здоровья на трудовую деятельность, ведение домашнего хозяйства, взаимоотношение с другими людьми, личную жизнь, половую жизнь, любимые занятия, увлечения, активный отдых. Заполнение самим пациентом занимает 10 мин. Каждому предполагаемому ответу первой части опросника присвоены балльные значения, представляющие собой взвешенную величину, вычисленную в большом популяционном исследовании. Их сумма равна 100, что соответствует наихудшему уровню КЖ по данному параметру. Методика хорошо валидизирована. Суммированием значений положительных ответов в каждом разделе получают величину показателя КЖ. Имеется раздел, отражающий довольно

полно болевые ощущения исследуемого, что является основанием для более целесообразного использования этой методики у больных с ИБС, как при наличии хронической сердечной недостаточности, так и без таковой. Полученные значения качества жизни хорошо коррелируют с функциональным классом ХСН по классификации *NYHA*. Эта методика довольно популярна, имеет ряд версий, тщательно валидизированных в специальных исслелованиях.

Среди общих методик, применяемых для оценки КЖ больных с сердечно-сосудистой патологией, чаще всего используют опросник SF-36, состоящий из 36 вопросов, разделённых на 8 категорий. Расчёты дают значения каждой категории КЖ от 0 до 100 баллов, отражающих уровень КЖ больного по возрастающей. Эта методика тщательно валидизирована в исследованиях пациентов различной популяции. Она обладает более высокой чувствительностью по сравнению с NHP. В настоящее время методику SF-36 рассматривают как «золотой» стандарт общих методик оценки КЖ больных с поражением системы кровообращения. К её недостаткам относят определённую сложность при заполнении опросника, что несколько ограничивает применение этой методики у пожилых больных. Создана более короткая версия опросника SF-36, состоящая из 12 вопросов (SF-12), отражающих два аспекта качества жизни: физический и психологический. Эта методика сопоставима с SF-36, но не обладает необходимой чувствительностью при динамических наблюдениях больных кардиологического профиля.

Сравнительная характеристика результатов исследований с применением общих методик оценки КЖ пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы свидетельствует, что пока нет общей методики с достаточно высокой чувствительностью для определения изменений качества жизни таких больных в результате медикаментозных и немедикаментозных вмешательств. Наиболее близки к таким требованиям результаты работ, выполненных с применением методики *SF-36*, в сочетании с данными болезнь-специфических методик.

К болезнь-специфическим методикам изучения КЖ больных с патологией системы кровообращения относят методические подходы, позволяющие определить выраженность того или

иного признака заболевания, в том числе способ визуальноаналоговых шкал (ВАШ). Эти шкалы представляют собой отрезки прямой определённой длины, начало которой соответствует минимальной выраженности определённого признака, а конец – максимальной его величине. Больной самостоятельно отмечает точку на прямой, которая отражает выраженность определённого симптома (Visual analogu Scale of Beathlessenes). К таким методикам, позволяющим количественно определить выраженность проявлений болезни (одышки, отёков, общей утомляемости и др.), относят опросники как более раннего периода исследований качества жизни, так и результаты последних лет. $EuroQol\ (EQ-5D)$ — общий опросник качества жизни, разработанный Европейской группой исследования качества жизни. EQ-5D — многомерный инструмент оценки качества жизни, который может быть выражен с помощью одного показателя — индекса. EQ-5D состоит из 2-х частей. Первая часть — опросник, который заполняется самостоятельно и включает 5 компонентов. Эти компоненты связаны со следующими аспектами жизни: подвижность, самообслуживание, активность в повседневной жизни, боль/дискомфорт и беспокойство/депрессия. Каждый компонент разделён на три уровня в зависимости от степени выраженности проблемы. Комбинирование этих уровней по 5 компонентам позволяет получить 243 варианта «состояния здоровья». Эта часть опросника может быть представлена как профиль EQ-5D profile, состоящий из 5 компонентов, или как индекс здоровья — EQ-5D utility. Последний удобен для использования в фармакоэкономических расчётах. Вторая часть опросника представляет собой ВАШ, так называемый «термометр здоровья». Это 20 см вертикальная градуированная линейка, на которой 0 означает самое плохое, а 100 – самое хорошее состоякоторои о означает самое плохое, а тоо — самое хорошее состол ние здоровья. Обследуемый делает отметку на «термометре» в том месте, которое отражает его состояние здоровья на момент заполнения. Эта часть опросника представляет собой количественную оценку общего статуса здоровья. Опросник EQ-5D используют для фармакоэкономического анализа.

Среди новой генерации опросников оценки симптомов следует отметить опросник серии Comprehensive Symptom Profile (CSP) – Coronary Artery Disease (CAD), разработанный в рамках 120

российско-американского проекта Центром изучения качества жизни и здоровья Нью-Джерси (New Jersey Center for Quality of Life and Health Outcome Research) и Межнациональным центром исследования КЖ. В данном опроснике пациенту предлагается по 10 бальной шкале оценить выраженность 27 симптомов, которые у него имеются. Самый низкий показатель равный «0» говорит об отсутствии симптома и соответственно самый высокий показатель «10» говорит о яркой выраженности симптома у папиента.

Изучение КЖ и симптомов у больных после применения и без использования КТ, позволит получить комплексную информацию о результатах лечения различных категории пациентов.

Глава IX

ЗАКОНОДАТЕЛЬНЫЕ ОСНОВЫ РАЗВИТИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Вопрос об отнесении клеток человека к объектам гражданских и иных правоотношений до недавнего времени не являлся актуальным. Клетки человека столетиями рассматривались как составная часть человеческого организма (состоящего из органов, тканей и собственно клеток, объединенных в определенные системы и обеспечивающих единство среды человеческого организма (гомеостаз), его саморегуляцию и адаптацию к внешним условиям среды). Вне организма клетки быстро погибали, да и не было какого-либо практического смысла в их сохранении (они, как правило, не представляли никакой ценности для конкретной личности либо общества). Ситуация в отношении отдельных клеток (совокупности клеток) стала кардинально меняться в первой половине XX в. В 1900-1910 гг. К. Ландштейнером, Я. Янским и некоторыми другими учёными (Дуткевич И.Г., 2002) были открыты и описаны четыре группы крови, используемые в трансфузиологии и до настоящего времени. С этого момента кровь активно и в больших количествах изымается из организма доноров и используется в медицинских целях.

С середины XX в. из области экспериментов в практическую медицину шагнула *трансплантология*, позволив осуществлять пересадку человеческих органов и тканей как совокупности специализированных и дифференцированных определённым образом клеток.

9.1. Законолательство в РФ

Существенные достижения учёных в изучении и применении СК в исследовательской и клинической практике требуют определённого законодательного регулирования.

Необходимо отметить, что в РФ имеется законодательная база применения органов и тканей человека в медицине. Закон о Трансплантации и ряд подзаконных актов, создают правовую базу *трансплантологии*. В Приказе 357 содержится перечень 122

органов и тканей, которые могут использоваться для трансплантации. Обращает на себя внимание тот факт, что российское законодательство не содержит, на наш взгляд, чёткого определения органа и ткани, что может в определённых случаях создавать проблемы при правовой квалификации отношений, складывающихся в клинической практике и при проведении некоторых исследований. В частности, как определить, а точнее к чему отнести к трансплантации или введению, если на никелидтитановых носителях в подкожно-жировую клетчатку помещают гомогенат фетальной поджелудочной железы?

Следует также отметить, что Закон о Трансплантации, а именно часть 2 Статья 2 указанного Закона, прямо исключает применение его норм к органам, их частям и тканям, имеющим отношение к процессу воспроизводства человека, включающие в себя репродуктивные ткани (яйцеклетку, сперму, яичники, яички или эмбрионы), а также к крови и ею компонентам.

Термин «Стволовые Клетки» используется в ряде актов, принятых в РФ. Такие акты принимаются как на региональном уровне (примером могут служить акты, регулирующие создание и деятельность банка СК в Москве, принятые московским правительством [Приказ . № 659], так и акты федеральных органов).

На взгляд авторов закрепление на законодательном уровне понятия *стволовых клеток*, *клеточных технологий* и некоторых иных связанных с ними понятий, а также урегулирование порядка применения СК в исследовательских и клинических целях будет способствовать развитию здравоохранению вообще и высокотехнологичной медицины в частности.

Особо следует отметить необходимость как можно более полного включения в гражданский оборот СК. Это, по мнению авторов, будет способствовать скорейшему развитию КТ.

В связи с этим авторы разработали проект закона, целью которого будет регулирование применения СК. С одной стороны такой закон будет способствовать росту исследований в области КТ и применению СК в практической медицине, а с другой стороны – позволит установить чёткие рамки для такой деятельности.

Нельзя не отметить тот факт, что соматические клетки также содержат генетическую информацию, но они не предназна-

чены для её передачи, отличаются набором хромосом и некоторыми другими признаками. Лишь в последние годы, в связи с достижениями биологии, учёные «заставили работать» соматические клетки на передачу генетической информации, что положило начало развитию исследований по клонированию — созданию копий животных и даже человека, генетически идентичного другому живому или умершему существу, путём переноса в лишённую ядра женскую половую клетку ядра соматической клетки.

В России продлевается временный мораторий на репродуктивное клонирование. Однако нет никаких законодательных ограничений на работы с ЭСК с целью терапевтического клонирования. Статус предимплантационных зародышей и внутриутробной жизни не имеет чёткого юридического статуса. Поэтому, по мнению авторов, законодательство о правах человека не распространяется на внутриутробное развитие человека. Права зародышей могут быть защищены только средствами биоэтики, т.е. ситуация в России аналогична той, которая сложилась в Великобритании, Бельгии и Швеции, где разрешено клонирование ранних зародышей человека для получения ЭСК.

Важным документом, регулирующим развитие клеточных технологий в России, являются Основы законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан (прим. далее Основ), статья 43 которых гласит: «В практике здравоохранения используются методы профилактики, диагностики, лечения, медицинские технологии, лекарственные средства, иммунобиологические препараты и дезинфекционные средства, разрешённые к применению в установленном законом порядке. Не разрешённые к применению, но находящиеся на рассмотрении в установленном порядке методы диагностики, лечения и лекарственные средства могут использоваться в интересах излечения пациента только после получения его добровольного письменного согласия».

В настоящее время в той или иной мере урегулирован оборот крови и её компонентов, технологии забора, хранения, переработки, использования крови и её компонентов. В группу не разрешённых к применению в настоящее время технологий могут попасть некоторые методы терапии, основанные на исполь-

зовании эмбриональных клеток (прим. авторов: здесь говорится о клетках, полученных из внутренней клеточной массы бластоцисты). Однако, как можно убедиться, абсолютные медицинские показания и наличие согласия пациента позволяют в ряде случаев использовать такие технологии. В соответствии со ст. 47 Основ — «органы и (или) ткани человека не могут быть предметом купли, продажи и коммерческих сделок». Но данная статья лишь указывает на недопустимость отдельных сделок с такими объектами материального мира, как органы и ткани, косвенно признавая их объектами некоторых правоотношений.

Кроме того, ст. 35 Основ предоставляет каждой совершеннолетней женщине детородного возраста право на искусственное оплодотворение и имплантацию эмбриона, что возможно лишь за счёт использования половых клеток (как минимум сперматозоидов).

Таким образом, собственно СК человека, как самостоятельные объекты правоотношений (вне органов или тканей), либо выпадают из сферы законодательного регулирования (речь идёт о законах как актах высшей юридической силы), либо их применение регулируется подзаконными актами, в первую очередь приказами Минздрава России (Минздравсоцразвития России).

В законодательствах некоторых стран, в частности, США, Великобритании, Индии, Китай, Германия, Швеция, отражены определённые успехи в тех или иных областях изучения СК.

9.2. Законодательство в США

В США, вопреки широко распространённому мнению, никогда не существовало запрета на исследования в области СК. Указ Президента США Буша лишь ограничил работу с ЭСК только теми клеточными линиями, которые были получены до 9 августа 2001 года, даты принятия Указа, за счёт привлечения средств федерального правительства США. Таких линий, по некоторым данным, было 78, однако в действительности использоваться могли лишь 19 линий. Последующие попытки определённой части Конгресса США изменить отношение действующей Администрации к проблеме использования СК не привели к успеху. Нужно отметить, что консервативное в своём большин-

стве американское общество и определённая часть Конгресса США всегда с насторожённостью относились к проблеме использования СК, зачастую смешивая понятия «клонирование» и «использование СК». Между тем, клонирование не имеет никакого отношения к ЭСК, которые обычно изолируются из избыточного эмбрионального материала, получаемого при искусственном оплодотворении и поддерживаются in vitro соответствующими процедурами. Ни их выделение, ни их использование не требуют пересадки ядра, хотя есть некоторые цели, для достижения которых эта техника понадобится в будущем. Главной проблемой научного сообщества на сегодняшний день, по мнению американских учёных, является создание новых линий ЭСК. В настоящее время создавать или разрушать ранние зародыши запрещено. В то же время, согласно опросам двух третей населения, США поддерживают работы с ЭСК, направленные на лечение ныне живущих пациентов. Что касается работы с ГСК, то из-за разнообразия методов, используемых в отделениях и исследовательских центрах для работы со СК – представлено очень широко, управление по питанию и лекарственным средствам Food and Drug Administration (FDA) США выступило инициатором разработки стандартов забора, обработки, хранения распространения и трансплантации ГСК. Эти стандарты были разработаны в результате совместных усилий AABB – Американской ассоциации банков крови, FDA и FAHCT – Фонда для аккредитации терапии гемопоэтическими клетками. В 2000 году выпущено второе издание, озаглавленное Standards for Hematopoietic Progenitor Cell Services (Стандарты служб гемо-поэтических клеток-предшественников). Эти стандарты освещают четыре специфических вопроса:

- 1) Контроль учреждения, проводящего работу с гемопоэтическими стволовыми клетками;
- 2) Контроль обработки, начиная с забора крови и заканчивая размораживанием клеток для осуществления трансплантации;
 - 3) Стандарты готового продукта;
- 4) Анализ конкретных результатов трансплантаций гемопоэтических СК.

9 мая 2009 года вновь избранный Президент США Барак Обама подписал Указ (*Executive Order*), который снял определенные ограничения в отношении федерального финансирования исследований новых линий человеческих ЭСК.

Необходимо также подчеркнуть, что законодательство некоторых штатов (примером могут служить, прежде всего, Нью-Джерси, Калифорния, Миссури и Массачусетс) никогда и не вводило столь существенных ограничений для исследований в области применения СК.

9.3. Законодательство в отношении КТ в Западной Европе

У законодателей европейских государств в настоящее время единого подхода к использованию СК нет.

Либеральным можно считать законодательства Великобритании, Дании, Нидерландов и Швеции позволяющие вести исследования СК с использованием человеческих эмбрионов.

Законодательство Германии, Австрии и Италии признают такие исследования незаконными. Так Закон ФРГ о защите человеческого эмбриона от 13 декабря 1990 года (ESchG) и Закон ФРГ об исследованиях СК от 28 июня 2002 года (StZG) накладывают по сути запретительные ограничения для использования ЭСК, но позволяют работать с импортированными линиями эмбриональных СК, а также с ЭСК животных и СК из тканей взрослого человека.

В Великобритании, Бельгии и Швеции разрешены эксперименты с ЭСК для терапевтического клонирования клеток больного человека, разрешено создание банков эмбриональных СК. Разрешено создание и клонирование предимплантационных зародышей для изолирования линий ЭСК. Репродуктивное клонирование запрещено. Лицензии на работу с ранними зародышами и ЭСК выдаются специальной государственной комиссией.

9.4. Законодательство в Великобритании

Хотелось бы отдельно остановиться на порядке регулирования исследований СК в Великобритании, как стране, являющейся одним из мировых лидеров в этой области.

Основными законодательными актами в этой области являются: Закон о Фертилизации Человека и Эмбриологии 1990 года (Human Fertilisation and Embryology Act, 1990), Закон о Репродуктивном Клонировании Человека от 4 декабря 2001 года (Human Reproductive Cloning Act, 2001) и Положения о Фертилизации Человека и Эмбриологии (для исследовательских целей) 2001 года (Human Fertilisation and Embryology (Research Purposes), Regulations, 2001). Указанные акты определяют цели исследований: для углубления знаний в области лечения бесплодия, для разработки более эффективных методов контрацепции, для углубления знаний в области развития эмбриона, для углубления знаний о серьёзных болезнях и их лечения и для некоторых иных целей.

В Соединённом Королевстве необходимо получить специальную лицензию на проведение любых исследований в области СК. Такую лицензию выдаёт специальный орган – Управление Фертилизации Человека и Эмбриологии, *Human Fertilisation and Embryology Authority (HFEA)*.

Использование эмбрионов старше 14 дней является незаконным. СК должны быть изолированы из *бластоцисты* (внутренней клеточной массы) ещё раньше — на 5–6 день.

Лицензия выдаётся только для исследований в отношении эмбрионов созданных *in vitro*.

В соответствии с законодательством Великобритании репродуктивное клонирование запрещено. Также является незаконным помещение человеческого эмбриона в тело животного и животного эмбриона в женское тело.

Следует также особо отметить Доклад Специального комитета Палаты Лордов в отношении исследований СК (House of Lords, 2002 Report from the Select Committee Stem Cell Research). В Докладе обсуждается, какие клетки являются стволовыми; даётся определённая оценка перспективам использования СК в терапевтических целях; достаточно детально обсуждаются плюсы и минусы использования ЭСК и СК взрослых людей; отдельные главы посвящены правовому статусу эмбриона и вопросам клонирования. Доклад содержит определенные вывод и рекомендации в отношении использования СК. Необходимо также подчеркнуть, что Палата Лордов в Докладе обратилась к HFEA 128

и Департаменту Здравоохранения Великобритании с призывом рассматривать результаты лицензированных исследований в области СК на регулярной основе с тем, очевидно, чтобы своевременно вносить необходимые изменения в законодательство.

9.5. Законодательство в Европейском Союзе (ЕС)

Помимо национальных органов, регулированием СК занимаются и такие органы как EC.

Директива 2004/23/EC, принятая Европейским Парламентом 7 апреля 2004 года (Directive 2004/23/EC on setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells) устанавливает стандарты качества и безопасности в отношении донорства, хранения и использования человеческих органов и клеток.

Директива 2004/23/ЕС применяется в отношении всех человеческих органов за исключением: а) тканей и клеток, которые используются в качестве аутотрансплантанта во время оригинальной хирургической операции; б) крови и компонентов крови; в) органов и частей органов, если части органов будут использоваться как целый орган.

Директива 2004/23/ЕС также регулирует применение гамет (спермы и яиц) и эмбрионов.

Директива 2002/98/ЕС, принятая Европейским Парламентом 27 января 2003 года (Directive 2002/98/ЕС on setting standards of quality and safety for the collection, testing, processing, storage and distribution of human blood and blood components), устанавливает стандарты качества и безопасности сбора, проверки, хранения и использования человеческой крови и компонентов крови.

Директива 2006/17/ЕС, принятая Комиссией Европейского Союза 8 февраля 2006 года (Commission Directive 2006/17/ЕС of 8 February 2006 implementing Directive 2004/23/ЕС of the European Parliament and of the Council as regards certain technical requirements for the donation, procurement and testing of human tissues and cells), установила новые дополнительные правила безопасности использования человеческой ткани и клеток, включая СК.

9.6. СК и европейское патентное законодательство

Отдельно необходимо осветить подход европейских госу-

дарств к возможности запатентовать определенные СК.

В соответствии с Директивой 98/44/ЕС о правовой защите биотехнологических открытий от 6 июля 1998 года (Directive 98/44/EC of 6 July 1998 on the legal protection of biotechnological inventions) человеческое тело на различных стадиях своего формирования и развития или любое открытие одного из его элементов, включая цепочку или часть цепочки гена, не может быть запатентовано. Однако элемент, изолированный от человеческого организма или иным образом произведённый техническими методами, включая цепочку или часть цепочки гена, может быть запатентован, даже если структура такого элемента является идентичной структуре природного элемента. Очень важным является Решение Апелляционного Совета

Европейского Патентного Агентства от 25 ноября 2008 года (*WARF/Thomson application*), в соответствии с которым невозможно предоставить патентную защиту определённым СК, так как это нарушило бы публичный порядок. Это решение широко как это нарушило бы публичный порядок. Это решение широко обсуждается как в кругах учёных, занимающихся исследованиями в области СК, так и среди правоведов. Существует толкование указанного выше Решения, в соответствии с которым это Решение не касается патентоспособности открытий в области человеческих СК или культур. Решение устанавливает невозможность патентной защиты продуктов (в данном случае человеческих СК), которые могут быть получены только при условии разрушения человеческого эмбриона.

Как мы видим, практика применения законодательства о защите интеллектуальной собственности только складывается, но уже в настоящий момент можно сделать выводы, что, например, в Великобритании человеческий эмбрион, *томинотентные* человеческие ЭСК, процесс выделения СК из человеческого эмбриона не могут обладать патентной защитой, а *плюрипотентные* человеческие ЭСК (pluripotent hESC cells) такой защитой обладают (прим. авторов: плюрипотентные клетки получают из фетальных тканей).

Компетентные органы Швеции в основном придерживаются аналогичных позиций, но, например, процессы повторного использования человеческого эмбриона патентной защитой в Швеции не обладают.

Все это говорит о том, что практика распространения норм защиты прав на интеллектуальную собственность только складывается. И может измениться, если изменится отношение общества к проблеме использования СК.

9.7. Законодательство в странах Азии

Азиатские страны также занимают серьёзные позиции в исследовании СК. В Индии и Китае активно ведутся исследования как по получению линий ЭСК человека, так и выделению ЭСК из других биоисточников, например, межвидовых клеточных гибридов. С точки зрения авторов, в настоящее время складывается неофициальное преимущество в развитии разработок в области КТ в азиатских странах, по сравнению с Европой и США. Имеются некоторые особенности законодательных баз в Индии и Китае

9.7.1. Индия

В одном из недавних номеров журнала Forbes India помещена статья о перспективах Индии в исследовании СК (Shishir Prasad, Stem Cell Research: Advantage India, Forbes India February 6, 2010). Интересна оценка цепочки добавленной стоимости, изложенная в статье: так предпринимательский риск бизнесов по хранению СК (stem cell storage) оценивается как средний, такими же автор статьи ожидает и прибыли. Исследования в области СК (R&D) оцениваются как высоко рискованные, вместе с тем и прибыль от таких исследований оценивается как потенциально высокая. Клинические исследования (clinical trial) оцениваются как низко рискованные операции, такой же ожидается и прибыль. Обращает на себя внимание, что клеточная терапия (stem cell therapy) оценивается как низко рискованная и вместе с тем высоко доходная деятельность.

В значительной степени успех индийских учёных в исследовании и применении СК обусловлен отсутствием каких-либо существенных законодательных ограничений в области исследования и применения СК. По сути дела чуть ли не единственным документом, регулирующим исследования и применение СК в Индии, является Руководство по исследованию СК и клеточной терапии, изданное в ноябре 2007 года Индийским советом по медицинским исследованиям (Indian Council of Medical Research, Guidelines for stem cell research and therapy). Руководство содержит достаточно подробное регулирование вопросов исследования и использования СК и даже содержит специальную главу, посвящённую коммерциализации применения СК и их патентоспособности, чем в определённой степени повторяет положения доклада Специального Комитета Палаты Лордов Великобритании 2002 года.

9.7.2. Kumaŭ

Законодательство Китая является одним из наиболее либеральных в отношении изучения возможностей СК. Однако и в Китае имеются некоторые ограничения по использованию ЭСК. В 2003 году Министерство науки и технологии и Министерство здравоохранения выпустили руководство по изучению человеческих ЭСК. Так руководство содержит запрет на любые исследования в отношении клонирования человека и требует, чтобы эмбрионы, используемые для получения СК получались из 1) spared gamete или бластоцист после экстракорпорального оплодотворения; 2) ФК, полученных из абортного материала; 3) бластоцист или партеногенетически разделённых бластоцист, полученных путём переноса ядра соматической клетки; или 4) гамет доноров.

Естественно обращает на себя внимание тот факт, что многие учёные из Китая, судя по многочисленным публикациям, очень успешно работают в лабораториях США. Учитывая менталитет учёных Поднебесной, не трудно догадаться, что в ближайшем времени и американские достижения могут быть аккумулированы для разработок в области КТ в самом Китае.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Последние достижения в биологии СК привели к концепции регенеративной медицины, которая базируется на терапевтическом потенциале СК обеспечивать восстановление дегенеративных или повреждённых тканей. Терапия с использованием СК может быть использована для лечения дегенеративных расстройств, связанных с потерей функций взрослых СК, таких как гематологические, сердечно-сосудистые, мышечные и неврологические заболевания, патологии желудочно-кишечного тракта и хронические заболевания печени. СК могут быть получены из различных источников, включая эмбрионы, фетальные ткани, пуповинную кровь и взрослые органы. Будучи изолированными, такие клетки могут быть сподвигнуты к росту и дифференциации в функциональный материал для замены клеток и тканевой инженерии. ЭСК могут поддерживаться в недифференцированном состоянии неопределённое время, хотя при длительном периоде культивирования могут развиться генетические нарушения. ЭСК и их производные могут служить простым доступным источником для получения большого числа клеток для регенеративной медицины. Многообещающим альтернативным источником для лечения с применением СК могут быть клетки, полученные из фетальных органов и плаценты, которые не формируют тератомы/тератокарциномы в организме человека. В частности, несколько исследований показали, что СК пуповинной крови являются легкодоступным источником МСК, которые могут быть легко доступны для трансплантации или для последующего культивирования и обработки перед клеточной терапией. Пластичность и доступность СК пуповинной крови позволяют создать специализированные банки, где такие клетки могут собираться и храниться для будущего использования. И, наконец, культуральные работы или стимулирование взрослых СК обещает оказаться хорошим инструментом КТ, так как они могут усилить внутренний регенеративный потенциал без риска отторжения и преодолеть этические и политические вопросы, касающиеся ЭСК.

В гепатологии наиболее перспективным применением КТ является лечение печёночной недостаточности. Хронические

печёночные патологии поражающие пятую часть органа, зачастую требуют ортотопической трансплантации печени (ОТП). Учитывая ограниченное количество донорских органов, рассматриваются различные альтернативы ОТП, включая КТ, которые исследуются в настоящий момент во всем мире. КТ в гепатологии имеют множество преимуществ по сравнению с ОТП: клетки могут быть выращены *in vitro*, генетически обработанные, замороженные, полученные от самого пациента и введены без серьёзного хирургического вмешательства. Возможно лечение, основанное на применении самих клеток и их введения, а также развития биоартифициальных систем печени. Биопечени в основном применяются как поддерживающий метод для пациентов, у которых не может быть выполнена ОТП или находящихся на «листе ожидания» ОТП, и у которых *трансплантация* клеток имела ограниченный общий эффект. Следовательно, терапия, основанная на применении СК, является востребованной, как новая альтернатива ОТП при терминальных стадиях печёночной недостаточности. Исследованы возможности использования аутологичных клеток из костного мозга пациента в лечении заболеваний печени. Очевидно, что СК костного мозга физиологически вовлечены в процесс восстановления клеток печени. Возможный терапевтический потенциал таких клеток исследован интрапортальной аутологичной трансплантацией, которая достигла определённых клинических успехов.

Можно констатировать, что использование взрослых СК для лечения болезней желудочно-кишечного тракта и поражений печени имеет ряд преимуществ, таких как лёгкость в применении, неограниченность материала (принимая во внимание возможность размножения клеток *in vitro*) и отсутствие риска отторжения, или необходимости иммуноподавляющей терапии в случае применения *аллогенных клеток*. Вместе с тем, некоторые существенные проблемы ограничивают распространение таких методов лечения в клинической практике. Основная из них – это вирусное поражение печени, когда вирус может иметь внепеченочную локализацию и полученный от пациента материал может быть непригоден из-за инфицированности. Вторая, не менее важная – материал, полученный от хронически больно-

го пациента не имеет достаточного потенциала для активизации эндогенной регенерации.

Будущее регенеративной медицины основанной на применении СК требует более глубоких знаний биологии СК для того, чтобы предотвратить и лечить болезни человека, а при невозможности излечить кардинально изменить качество и продолжительность жизни. КТ являются эффективным способом коррекции состояний человека при использовании в периоде реабилитации после тяжёлых и серьёзных нагрузок любого вида (психоэмоциональных, физических, послеоперационном периоде и т.п.), что в результате приводит к улучшению качества жизни конкретного пациента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Бокерия Л.А., Беришвили И.И., Сигаев И.Ю. Альтернативные методы реваскуляризации миокарда // Вестн Росс Акад Мед Наук.— 2009.- N 12.— С. 46-51.
- 2. Долгих М.С. Перспективы лечения печёночной недостаточности стволовыми клетками // Биомед Хим.— 2008.— Том 53.— Вып. 4.— С. 376—391.
- 3. Дуткевич И.Г. К истории открытия групп крови // Трансфузиология. 2002. Т. 3, № 1. С. 49–53.
- 4. Иванов Д.В. Влияние общего охлаждения на реологические показатели крови и их коррекция с помощью полэтиленоксидов молекулярной массой 400 и 1500: Дисс. ... на соискание ученой степени кандидата медицинских наук.— 2000.
- 5. Иванов Д.В., Корниенко А.Н., Лищук А.Н., Немытин Ю.В., Станков Д.С., Хадарцев А.А. Безопасность проведения трансплантаций клеток фетальной печени плода 2-го триместра гестации у больных кардиохирургического профиля // Вестник новых медицинских технологий.— 2006.— Т. XIII, № 2.— С. 187.
- 6. Иванов Д.В., Хадарцев А.А. Клеточные технологии в лечении патологии печени // Вестник новых медицинских технологий. 2006. Т. XIII, № 2. С. 185–187.
- 7. Иванов Д.В., Рязанов А.И., Хадарцев А.А. Трансплантация гепатоцитов в лечении заболеваний печени-настоящее и будущее // Вестник новых медицинских технологий.— 2006.— Т. XIII, N_2 3.— С. 122-125.
- 8. Иванов Д.В. Качество жизни при кардиомиопатиях после воздействия СК // Вестник новых медицинских технологий.— 2009.— Т. XVI, № 2.— С. 177.
- 9. Иванов Д.В. Ишемическая болезнь сердца и клеточные технологии // Вестник новых медицинских технологий. 2009. Т. XVI, № 2. С. 177.
- 10. Иванов Д.В. Клеточные технологии при алкогольном поражении печени // Вестник новых медицинских технологий.— 2009.— Т. XVI, № 3.— С. 177-178.
- 11. Иванов Д.В. Клеточные технологии при вирусном поражении печени // Вестник новых медицинских технологий.— 2009.— Т. XVI, № 3.— С. 178.

- 12. Иванов Д.В. Клеточные технологии при гиперлипидемиях // Вестник новых медицинских технологий. 2009. Т. XVI, № 3. С. 178—179.
- 13. Иванов Д.В., Хадарцев А.А. Влияние клеточных технологий на физическое и психическое здоровье высококвалифицированных спортсменов // Вестник новых медицинских технологий. 2009. Т. XVI, № 3. С. 200—201.
- 14. Иванов Д.В., Хадарцев А.А., Хадарцев В.А., Седова О.А., Митюшкина О.А. Клиническое использование СК // Вестник новых медицинских технологий. 2009. Т. XVI, № 4. С. 31–33.
- 15. Иванов Д.В., Ленников Р.В., Морозов В.Н., Савин Е.И., Субботина Т.И., Хадарцев А.А., Яшин А.А. Эффект доноракцептерного переноса проходящим электромагнитным излучением сано- и патогенных характеристик биообъекта и создание новых медицинских технологий // Вестник новых медицинских технологий.— 2010.- Т. XVII, № 2.- С. 10-15.
- 16. Иванов Д.В., Чабаненко А.В. Некоторые вопросы законодательного регулирования клеточных технологий: Российский и зарубежный опыт // Вестник новых медицинских технологий. ~ 2010 . Т. XVII, № $\sim 2.$ С. ~ 286
- 17. Иванов Д.В., Хадарцев А.А. Клеточные технологии и синергетика // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. 2009. Т. 8, № 3. С. 751–754.
- 18. Иванов Д.В., Хадарцев А.А. Клеточные технологии в лечении подагры как системного заболевания // Системный анализ и управление в биомедицинских системах.— 2009.— Т. 8, № 3.— С. 573—577.
- 19. Киясов А.П., Гумерова А.А., Титова М.А. Овальные клетки предполагаемые стволовые клетки печени или гепатобласты? // Клет Транспл. 2006.— Том I, № 2.— С. 55–58.
- 20. Козлова Е.Н. Стратегия восстановления утраченных сенсорных связей в спинном мозге // Мол Биол.— М., 2008.— Т. 42, № 5.— С. 820–829.
- 21. Корниенко А.Н., Иванов Д.В., Лищук А.Н., Немытин Ю.В., Станков Д.С. Профилактика осложнений при трансплантации клеток фетальной печени кардиохирургическим больным // Вестник новых медицинских технологий. 2006. Т. XIII, № 2. С. 187—188.
- 22. Кругляков П.В., Соколова И.В., Зинькова Н.Н., Виде С.К., Александров Г.В., Петров Н.С., Полынцев Д.Г. In vitro и in

- vivo дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток в кардиомиоцитарном направлении // Бюлл Экс Биол Мед.— 2006.— Т. 142, № 4.— С. 503–506.
- 23. Мороз В.В., Онищенко Н.А., Лебедев В.Г., Сидорович Г.И., Люрщикова А.В., Расулов М.Ф., Крашенинников М.Е., Севастьянов В.И. Влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на процессы локального радиационного повреждения у крыс после местного облучения бета-радиацией // Радиатц Биол Радиоэкол.— 2009.— Т. 49, № 6.— С. 688—693.
- 24. Мусина Р.А., Де Велльен Л.А., Фелицына С.Б. СК, полученные из отслоившегося эндометрия, способ их получения и применения // Бюллетень ЕАПО.— 2006.— № 3 (заявка 2004000031 (RU) 2004.08.11).
- 25. Мягков Б.Р. «Булгаков М.А. Избранные сочинения: В 2 т. Т. 1.». М.: Рипол-Классик, 1997. С. 285.
- 26. Потапов И.В., Кириллов И.А. Повышение ангиогенеза как основа репаративного морфогенеза при ишемическом повреждении миокарда // Вестн Росс Акад Мед Наук.— 2007.— № 9.— С. 3—9.
- 27. Приказ Департамента здравоохранения Москвы «Об организации сбора СК» от 11 ноября 2003 г. № 659.
- 28. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации и Российской академией медицинских наук от 25 мая 2007 г. № 357/40 «Об утверждении перечня органов и (или) тканей человека объектов трансплантации, перечня учреждений здравоохранения, осуществляющих трансплантацию органов и (или) тканей человека, и перечня учреждений здравоохранения, осуществляющих забор и заготовку органов и (или) тканей человека» (Приказ 357).
- 29. Репин В.С., Сабурина И.Н., Сухих Г.Т. Клеточная биология фетальных тканей и медицина // Клеточные технологии в биологии и медицине.— $2007.- \text{ N} _{\odot} 3.- \text{ C}.$ 123–133.
- 30. Репин В.С., Сухих Г.Т. Медицинская клеточная биология.— М.: БЭБиМ, 1998.-200 с.
- 31. Сабурина И.Н., Горкун А.А., Кошелева Н.В., Семенова М.Л., Пулин А.А., Репин В.С. Сопоставление поведения стромальных клеток пупочного канатика и мультипотентных стромальных клеток взрослого костного мозга в 2-D и 3-D культуре:

- моделирование стромальной регенерации // Вестник новых медицинских технологий. 2009. № 4. С. 9–11.
- 32. Соколова И.В., Федотова О.Р., Зинькова Н.Н., Кругляков П.В., Полынцев Д.Г. Эффект трансплантации мезенхимальных стволовых клеток на когнитивную функцию у крыс с инсультом // Бюлл Эксп Биол Мед.— 2006.— Т. 142. №4.— С. 511—514.
- 33. Станков Д.С., Иванов Д.В., Хадарцев А.А., Субботина Т.И. Влияние эндометриальных клеток на хроническое ишемическое повреждение миокарда // Вестник новых медицинских технологий.— 2010.— Т. XVII, № 1.— С. 47—49.
- 34. Сухих Г.Т., Спивак Н.И., Малайцев В.В., Богданова И.М., Шевчук В.А. Мезенхимальные прогениторные клетки. Биологические характеристики и перспективы для их использования // Физиол Жр.— 2007.— Т. 53, № 1.— С. 62—76.
- 35. Трактуев Д.О., Парфенова Е.В., Ткачук В.А., Марч К.Л. Стромальные клетки жировой ткани пластический тип клеток, обладающих высоким терапевтическим потенциалом // Цитология.— 2006.— Т. 48, № 2.— С. 83—94.
- 36. Фриденштейн А.Я., Куралесова А.И. Остеогенные клет-ки-предшественники костного мозга радиохимер. Анализ мето-дом гетеротопной трансплантации // Онтогенез.— 1971.— № 2(5).— С. 458–465.
- 37. Хадарцев А.А., Еськов В.М., Хадарцев В.А., Иванов Д.В. Клеточные технологии с позиции синергетики // Вестник новых медицинских технологий. 2009. Т. XVI, № 4. С. 7—9.
- 38. Хадарцев А.А., Иванов Д.В., Наумова Э.М., Хасая Д.А. Эндометриальные СК менструальной крови и возможность их применения в заместительной терапии // Вестник новых медицинских технологий. 2009. Т. XVI, № 3. С. 147–151.
- 39. Хадарцев А.А., Иванов Д.В., Степанова Т.В., Станков Д.С., Горбаков В.В. Эффективность клеточной терапии у больных хроническим гепатитом С, не ответившим на курс противовирусной терапии пегилированными интерферонами и рибавирином // Вестник новых медицинских технологий.— 2007.— Т. XIV, N = 3.— С. 107.
- 40. Хадарцев А.А., Иванов Д.В., Шаталов А.В., Потапов И.В. Качество жизни у пациента с подагрой после аутотрансплантации клеток костного мозга(клиническое наблюдение) //

- Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2006. Т. 1, № 3(5). С. 73–75.
- 41. Цыб А.Ф., Рошаль Л.М., Юшаков В.В., Коноплянников А.Г., Шушкевич Г.Н., Бандурко Л.Н., Ингель И.Е., Семенова Ж.Б., Коноплянникова О.А., Лепехина Л.А., Кальшина С.С., Верховский Ю.Г., Шевчук А.С., Семенкова И.В. Морфофункциональное изучение терапевтического эффекта аутологичных мезенхимальных стволовых клеток при экспериментальном диффузном поражении головного мозга у крыс // Бюлл Эксп Биол Мед.— 2006.— Т. 142, № 1.— С. 140—147.
- 42. Шахов В.П., Хлусов И.А., Дамбаев Г.Ц., Зайцев К.В., Егорова А.Б., Шахова С.С., Загребин Л.В., Волгушев С.А. Введение в методы культуры клеток, биоинженерии органов и тканей / Под ред. В.В. Новицкого, В.П. Шахова, И.А. Хлусова, Г.Ц. Дамбаева. Томск: STT, 2004. 386 с.
- 43. Шумаков В.И., Блюмкин В.Н., Скалецкий Н.Н. / В кн.: Трансплантация островковых клеток поджелудочной железы.— М., 1995.— С. 5.
- 44. Ярыгин К.Н. Роль резидентных и циркулирующих стволовых клеток в физиологической и репаративной регенерации // Патол Физиол Эксп Тер.— 2008.— 1 C. 2 8.
- 45. Abbott J.A., Garry R. The surgical management of menor-rhagia // Human Reproduction Update.— 2002.— Vol. 8, No. 1.— P. 68–78.
- 46. Abdallah B.M., Haack-Surrensen M., Burns J.S., et al. Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite [corrected] extensive proliferation [published correction appears in Biochem Biophys Res Commun. 2005;329(4):1361]. Biochem Biophys Res Commun. 2005;326(3):527-538.
- 47. Abdel-Latif A., Bolli R., Tleyjeh I.M., et al. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis // Arch Intern Med. 2007. Vol. 167. P. 989–997.
- 48. Abe R., Donnelly S.C., Peng T., Bucala R., Metz C.N. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites // J Immunol. 2001. Vol. 166. P. 7556–7562.
- 49. Altman G.H., Horan R.L., Martin I., Farhadi J., Stark P.R., Volloch V., Richmond J.C., Vunjak-Novakovic G., Kaplan D.L. Cell

- differentiation by mechanical stress // FASEB J.- 2002.- Vol. 16.- P. 270-272.
- 50. Altman J. Autoradiographic study of degenerative and regenerative proliferation of neuroglia cells with tritiated thymidine // Exp Neurol. 1962. Vol. 5. P. 302–318.
- 51. Alviano F., Fossati V., Marchionni C. et al. Term amniotic membrane is a high throughput source for mulripotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro // BMC Dev.Biol. 2007. Vol. 7. P. 11.
- 52. Arrell D.K., Niederländer N.J., Faustino R.S., Behfar A., Terzic A. Cardioinductive network guiding stem cell differentiation revealed by proteomic cartography of tumor necrosis factor alphaprimed endodermal secretome // Stem Cells.— 2008.— Vol. 26.— P. 387–400.
- 53. Asahina K., Teramoto K., Teraoka H. Embryonic stem cells: hepatic differentiation and regenerative medicine for the treatment of liver disease // Curr Stem Cell Res Ther. 2006, May. Vol. 1, № 2. P. 139–156.
- 54. Backlund E.O., Granberg P.O., Hamerger B., et al. // J.Nerurosurg.— 1985.— Vol. 62.— P. 169—173.
- 55. Baddoo M., Hill K., Wilkinson R. et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection // J Cell Biochem.— 2003.— Vol. 89.— P. 1235—1249.
- 56. Badiavas E.V., Falanga V. Treatment of chronic wounds with bone marrow-derived cells // Arch Dermatol.— 2003.— Vol. 139.— P. 510–516.
- 57. Bailey A.S., Willenbring H., Jiang S., Anderson D.A., Schroeder D.A., Wong M.H., Grompe M., Fleming W.H. Myeloid lineage progenitors give rise to vascular endothelium // Proc Natl Acad Sci USA. 2006, Aug 29. Vol. 103, № 35. P. 13156–13161.
- 58. Bakken A.M. Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells. Review // Curr Stem Cell Res Ther.— 2006.— Vol. 1(1).—P. 47–54.
- 59. Baksh D., Song L., Tuan R.S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy // J Cell Mol Med. 2004. Vol. 8. P. 301–316.
- 60. Ballen K.K., Haley N.R., Kurtzberg J., et al. Outcomes of 122 diverse adult and pediatric cord blood transplant recipients from a large cord blood bank // Transfusion.— 2006.— Vol. 46(12).— P. 2063–2070.

- 61. Bang O.Y., Lee J.S., Lee P.H., Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients // Ann Neurol. 2005. Vol. 57(6). P. 874–882.
- 62. Baptiste D.C., Fehlings M.G. Update on the treatment of spinal cord injury // Prog Brain Res. 2007. Vol. 161. P. 217–233.
- 63. Battula V.L., Bareiss P.M., Tremi S. et al. Human placenta and bone-marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF- containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation // Differentiation.— 2007.— Vol. 75.—P. 279—291.
- 64. Battula V.L., Treml S., Abele H., Bühring H.J. Prospective isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human placenta using a frizzled-9-specific monoclonal antibody // Differentiation.—2008.—Vol. 76.—P. 326—336.
- 65. Baum C.M., Weissman I.L., Tsukamoto A.S., Buckle A.M., Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population // Proc Natl Acad Sci USA.—1992.— Vol. 87.— P. 2804—2808.
- 66. Behfar A., Faustino R.S., Arrell D.K., Dzeja P.P., Perez-Terzic C., Terzic A. Guided stem cell cardiopoiesis: discovery and translation // J Mol Cell Cardiol. 2008. Vol. 45. P. 523–529.
- 67. Bellini A., Mattoli S. The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses // Lab Invest.— 2007.— Vol. 87.— P. 858—870.
- 68. Bensidhoum M., Chapel A., Francois S., Demarquay C., Mazurier C., Fouillard L., Bouchet S., Bertho J.M., Gourmelon P., Aigueperse J., et al. Homing of in vitro expanded Stro-1– or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment // Blood.— 2004.— Vol. 103.—P. 3313—3319.
- 69. Bianco P., Robey P.G. Stem cells in tissue engineering // Nature. 2001. Vol. 414. P. 118–121.
- 70. Bickenbach J.R., Chism E. Selection and extended growth of murine epidermal stem cells in culture // Exp Cell Res.— 1998.— Vol. 244.—P. 184—195.
- 71. Bickenbach J.R., Dunnwald M. Epidermal stem cells: characteristics and use in tissue engineering and gene therapy // Adv Dermatol. 2000. Vol. 16. P. 159–183.

- 72. Biervliet et al. A successful cycle of IVF-ET after treatment of endometrial ossification; case report and review // Journal of Obstetrics and Gynaecology.—2004.—Vol. 24, Issue 4.—P. 472–473.
- 73. Billon N., Jolicoeur C., Raff M. Generation and characterization of oligodendrocytes from lineage-selectable embryonic stem cells in vitro // Methods Mol Biol. 2006. Vol. 330. P. 15–32.
- 74. Bird and Willis. The production of smooth muscle by the endometrial stroma of the adult human uterus // J Pathol Bacteriol.—1965.—Vol. 90(1).—P. 75–81.
- 75. Blashki D., Short B., Bertoncello I., Simmons P.J., Brouard N: Identification of stromal MSC candidates from multiple adult mouse tissues // In Int Soc Stem Cell Res 4th Annual Meeting.—2006.—P. 206.
- 76. Bobis S., Jarocha D., Majka M. Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications // Folia Histochemica et citobiologica.—2006.—Vol. 44(4).—P. 215—230.
- 77. Bossolasco P., Montemurro T., Cova L., et al. Molecular and phenotypic charactetization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential // Cell Res. 2006. Vol. 16. P. 329–336.
- 78. Bouwens L., Rooman I. Regulation of pancreatic beta-cell mass // Physiol Rev. 2005, Oct. Vol. 85, № 4. P. 1255–1270.
- 79. Branch D.R., Calderwood S., Cecutti M.A., Herst R., Solh H. Hematopoietic progenitor cells are resistant to dimethyl sulfoxide toxicity // Transfusion.— 1994.— Vol. 34.— P. 887—890.
- 80. Brayton C.F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): A review. Cornell Vet. 1997.
- 81. Brazelton T.R., Rossi F.M., Keshet G.I., Blau H.M. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice // Science.—2000.—Vol. 290(5497).—P. 1775—1779.
- 82. Brooke G., Tong H., Levesque J.P., Atkinson K. Molecular trafficking mechanisms of multipotent mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and placenta // Stem Cells Dev.–2008.–Vol. 1, № 7.–P. 929–940.
- 83. Brown D., Wagner D., Li X., Richardson J.A., Olson E.N. Dual role of the basic helix-loop-helix transcription factor scleraxis in mesoderm formation and chondrogenesis during mouse embryogenesis // Development.—1999.—Vol. 126.—P. 4317—4329.

- 84. Broxmeyer H.E. Biology of cord blood cells and future prospects for enhanced clinical benefit // Cytotherapy.— 2005.— Vol. 7.— P. 209–218.
- 85. Broxmeyer H.F., Srour E., Orschell C. et al. Cord blood stem cell and progenitor cells // Methods Enzymol.— 2006.— Vol. 419.—P. 439–473.
- 86. Brüstle O. Building brains: neural chimeras in the study of nervous system development and repair. Review // Brain Pathol.–1999.– Vol. 9(3).– P. 527–545.
- 87. Brüstle O., McKay R.D. Neuronal progenitors as tools for cell replacement in the nervous system // Curr Opin Neurobiol.—1996.—Vol. 6(5).—P. 688—695.
- 88. Buckner C.D., Epstein R.B., Rudolph R.H. et al. Allogeneic marrow engraftment following whole body irradiation in a patient with leukemia // Blood.—1970.—Vol. 35(6).—P. 741.
- 89. Campos L.S. $\beta1$ integrins and neural stem cells: making sense of the extracellular environment // BioEssays.— 2005.— Vol. 27.— P. 698–707.
- 90. Cao Q.L., Onifer S.M., Whittemore S.R. Labeling stem cells in vitro for identification of their differentiated phenotypes after grafting into the CNS // Methods Mol Biol.— 2002.— Vol. 198.— P. 307–318.
- 91. Cao Q., He Q., Wang Y., Cheng X., Howard R.M., Zhang Y., De Vries W.H., Shields C.B., Magnuson D.S., Xu X.M., Kim D.H., Whittemore S.R. Transplantation of ciliary neurotrophic factor-expressing adult oligodendrocyte precursor cells promotes remyelination and functional recovery after spinal cord injury // J Neurosci. 2010, Feb 24. Vol. 30, № 8. P. 2989–3001.
- 92. Cao Q.L., Zhang Y.P., Howard R.M., et al. Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage // Exp Neurol.— 2001.— Vol. 167(1).— P. 48–58.
- 93. Carlin R., Davis D., Weiss M., Schultz B., Troyer D. Expression of early transcription factors Oct4, Sox2 and Nanog by porcine umbilical cord (PI.JC) matrix cells // Reprod. Biol. Endocrinol.—2006.—Vol. 4.—P. 8.
- 94. Carpenter M.K., Inokuma M.S., Denham J., Mujtaba T., Chiu C.P., Rao M.S. Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells // Exp Neurol.— 2001.— Vol. 172(2).—P. 383–397.

- 95. Castro R.F., Jackson K.A., Goodell M.A., Robertson C.S., Liu H., Shine H.D. Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo // Science.— 2002.— Vol. 297(5585).— P. 1299.
- 96. Cervello I., Martinez-Conejero J.A., Horcajadas J.A., Pellicer A., Simon C. Identification, characterization and co-localization of label-retaining cell population in mouse endometrium with typical undifferentiated markers // Hum. Reprod.—2007.—Vol. 22.—P. 45–51.
- 97. Chambers I., Colby D., Robertson M., Nichols J., Lee S., Tweedie S., Smith A. Functional expression cloning of nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells // Cell.–2003.– Vol. 113.– P. 643–655.
- 98. Chang C.M., Kao C.L., Chang Y.L. et al. Placenta-derived multipotent stem cells induced to differentiate into insulin-positive cells. // Biochem. Biophys. Res. Commun.— 2007.— Vol. 357.— P. 414–420.
- 99. Chang Y.J., Shih D.T., Tseng C.P., Hsieh T.B., Lee D.C., Hwang S.M. Disparate mesenchyme-lineage tendencies in mesenchymal stem cells from human bone marrow and umbilical cord blood // Stem Cells.—2006.—Vol. 24.—P. 679—685.
- 100. Chen C.P., Kiel M.E., Sadowski D., McKinnon R.D. From stem cells to oligodendrocytes: prospects for brain therapy // Stem Cell Rev.–2007.– Vol. 3(4).– P. 280–288.
- 101. Chen C.P., Lee M.Y., Huang J.P. et al. Trafficking of multipotent mesenchymal stromal cells from maternal circulation through the placenta involves vascular endothelial growth factor-1 and integrins // Stem Cells.—2008.—Vol. 26.—P. 550—561.
- 102. Chen D., Zhao M., Mundy G.R. Bone morphogenetic proteins // Growth Factors. 2004. Vol. 22. P. 233–241.
- 103. Cheng Z., Ou L., Zhou X. et al. Targeted migration of mesenchymal stem cells modified with CXCR4 gene to infracted myocardium improves cardiac performance // Mol Ther.— 2008.— Vol. 16.— P. 571—579.
- 104. Chiavegato A., Bollini S., Pozzobon M. et al. Human amniotic fluid-derived stem cells are rejected after transplantation in the myocardium of normal, ischemic, immunosuppressed or immunodeficient rat // J. Mol.Cell. Cardiol.—2007.—Vol. 42.—P. 746—759.
- 105. Chiba T., Zheng Y.W., Kita K., Yokosuka O., Saisho H., Onodera M., Miyoshi H., Nakano M., Zen Y., Nakanuma Y., Nakauchi H., Iwama A., Taniguchi H. Enhanced Self-Renewal Capabil-

- ity in Hepatic Stem/Progenitor Cells Drives Cancer Initiation // Gastroenterology. 2007.
- 106. Chien C.C., Yenn B.l., Lee F.K. et al. In vitro differentiation of human placenta-derived multipotent cells into heparocyte-like cells // Stem Cells. 2006. Vol. 24. P. 1759–1768.
- 107. Cho N.H., Park Y.K., Kim Y.T., Yang H., Kim S.K. Lifetime expression of stem cell markers in the uterine endometrium // Fert. and Steril. 2004. Vol. 81(2). P. 403–407.
- 108. Cibelli J.B., Grant K.A., Chapman K.B., et al. Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates // Science.—2002.—Vol. 295 (5556).—P. 819.
- 109. Conconi M.T., Burra P., Di Liddo R. et al. CD105⁺ cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiation potential // Int.J.Mol.Med.– 2006.– Vol. 18.– P. 1089–1096.
- 110. Conget P.A., Minguell J.J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells // J Cell Physiol.—1999.—Vol. 181.—P. 67–73.
- 111. Conti C.J., Gimenez-Conti I.B., Conner E.A., Lehman J.M., Gerschenson L.E. Estrogen and progesterone regulation of proliferation, migration, and loss in different target cells of rabbit uterine epithelium // Endocrinology.—1984 Feb.—Vol. 114(2).—Vol. 345—351.
- 112. Coulombel L., Auffray I., Gaugler M.H., Rosemblatt M. Expression and function of integrins on hematopoietic progenitor cells // Acta Haematol.—1997.—Vol. 97.—P. 13–21.
- 113. Coutts M., Keirstead H.S. Stem cells for the treatment of spinal cord injury // Exp Neurol. 2008. Vol. 209(2). P. 368–377.
- 114. Craig W., Kay R., Cutler R.L., Lansdorp P.M. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells // J Exp Med.–1993.–Vol. 177.–P. 1331–1342.
- 115. Cui C.H., Uyama T., Miyado K., Terai M., Kyo S., Kiyono T., Umezawa A. Menstrual blood-derived cells confer human dystrophin expression in the murine model of Duchenne muscular dystrophy via cell fusion and myogenic transdifferentiation // Mol Biol Cell.—2007 May.—Vol. 18(5).—P. 1586—1594.
- 116. Cummings B.J., Uchida N., Tamaki S.J., Anderson A.J. Human neural stem cell differentiation following transplantation into spinal cord injured mice: association with recovery of locomotor function. // Neurol Res. 2006. Vol. 28(5). Vol. 474–481.
- 117. Cummings B.J., Uchida N., Tamaki S.J., et al. Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal 146

- cord-injured mice // Proc Natl Acad Sci USA.— 2005.— Vol. 102(39).— P. 14069—14074.
- 118. Daley G.Q., Hyun I., Lindvall O. Mapping the road to the clinical translation of stem cells // Cell Stem Cell.— 2008.— Vol. 2.— P. 139–140.
- 119. Datta N., Holtorf H.L., Sikavitsas V.I., Jansen J.A., Mikos A.G. Effect of bone extracellular matrix synthesized in vitro on the osteoblastic differentiation of marrow stromal cells // Biomaterials.—2005.—Vol. 26.—P. 971—977.
- 120. Dawn B., Tiwari S., Kucia M.J. et al. Transplantation of bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells attenuates left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction // Stem Cells.—2008.—Vol. 26.—P. 1646—1655.
- 121. De Coppi P., Bartsch G. Jr., Siddiqui M.M. et al. Isolation of amniotic stem cells with potential for therapy // Nat. Biotech.—2007.—Vol. 25.—P. 100–106.
- 122. Deguchi T., Komada Y., Sugiyama K., Zhang X.L., Azuma E., Yamamoto H., Sakurai M. Expression of homing-associated cell adhesion molecule (H-CAM/CD44) on human CD34+ hematopoietic progenitor cells // Exp Hematol.— 1999.— Vol. 27.— P. 542—552.
- 123. Dennis J.E., Carbillet J.P., Caplan A.I., Charbord P. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential // Cells Tissues Organs. 2002. Vol. 170. P. 73–82.
- 124. Deshpande D.M., Kim Y.S., Martinez T., et al. Recovery from paralysis in adult rats using embryonic stem cells // Ann Neurol.–2006.–Vol. 60(1).–P. 32–44.
- 125. Dezawa M., Ishikawa H., Itokazu Y., Yoshihara T., Hoshino M., Takeda S., Ide C., Nabeshima Y. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration // Science. 2005. Vol. 309. P. 314–317.
- 126. Dimmeler S., Burchfield J., Zeiher A.M. Cell-based therapy of myocardial infarction // Arterioscler Thromb Vasc Biol.—2008.—Vol. 28.—P. 208–216.
- 127. Doetsch F., Caille' I., Lim D.A., Garcı'a-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain // Cell.— 1999.— Vol. 97(6).— P. 703–716.

- 128. Doherty M.J., Canfield A.E. Gene expression during vascular pericyte differentiation // Crit Rev Eukaryot Gene Expr.—1999.—Vol. 9.—P. 1–17.
- 129. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells: the International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy. 2006. Vol. 8(4). P. 315–317.
- 130. Donaldson A., Armitage W.J, Denning-Kennall P.A., Nicol A.J., Bradley B.A., Hows J.M. Optimal cryopreservation of human umbilical cord blood // Bone Marrow Transplantation.—1996.—Vol. 18.—P. 725—731.
- 131. Du H., Taylor H.S. Contribution of bone marrow-derived stem cells to endometrium and endometriosis // Stem Cells.— 2007.— Vol. 25(8).— P. 2082–2086.
- 132. Dunnwald M., Tomanek-Chalkley A., Alexandrunas D., Fishbaugh J., Bickenbach J.R. Isolating a pure population of epidermal stem cells for use in tissue engineering // Exp Dermatol. 2001. Vol. 10. P. 45–54.
- 133. Edwards R.G., Brody S.A. Principle and Practice of Assisted Human Reproduction.—1995.—P. 17.
- 134. Eichmann A., Yuan L., Moyon D., Lenoble F., Pardanaud L., Breant C. Vascular development: from precursor cells to branched arterial and venous networks // Int J Dev Biol. 2005. Vol. 49, № 2–3. P. 259–267.
- 135. Eisenberg C.A., Burch J.B., Eisenberg L.M. Bone marrow cells transdifferentiate to cardiomyocytes when introduced into the embryonic heart // Stem Cells.—2006.—Vol. 24(5).—P. 1236–1245.
- 136. Emanuel P. AFS cells where do they fit on the continuum? The Hematologist: ASH News and Reports. 2007. Vol. 4, № 1.
- 137. Enzmann G.U., Benton R.L., Woock J.P., Howard R.M., Tsoulfas P., Whittemore S.R. Consequences of noggin expression by neural stem, glial, and neuronal precursor cells engrafted into the injured spinal cord // Exp Neurol. 2005. Vol. 195(2). P. 293–304.
- 138. Eriksson P.S., Perfilieva E., Bjork-Eriksson T., et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus // Nat Med.— 1998.— Vol 4(11).— P. 1313–1317.
- 139. Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // Nature.— 1981.— Vol. 292(5819).— P. 154.

- 140. Fassas A., Anagnostopoulos A., Kazis A. et al. Peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of progressive multiple sclerosis: first results of a pilot study // Bone Marrow Transplant.—1997.—Vol. 20.—P. 631.
- 141. Faustino R.S., Behfar A., Perez-Terzic C., Terzic A. Genomic chart guiding embryonic stem cell cardiopoiesis // Genome Biol. 2008.
- 142. Ferenczy A., Bertrand G., Gelfand M.M. Proliferation kinetics of human endometrium during the normal menstrual cycle // Am J Obstet Gynecol. 1979 Apr. Vol. 133(8). P. 859–867.
- 143. Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors // Science.— 1995.— Vol. 279(5256).— P. 1528–1530.
- 144. Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G., Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors // Science.— 1998.— Vol. 279.—P. 1528—1530.
- 145. Ferreira E., Pasternak J., Bacal N. et al. Autologous cord blood transplantation // Bone Marrow Transplant.— 1999.— Vol. 24.— P. 1041.
- 146. Fisher L.J., Gage F.H. Grafting in the mammalian central nervous system // Physiol Rev. 1993. Vol. 73(3). P. 583–616.
- 147. Foroni C., Galli R., Cipelletti B., et al. Resilience to transformation and inherent genetic and functional stability of adult neural stem cells ex vivo // Cancer Res. 2007. Vol. 67(8). P. 3725–3733.
- 148. Foster L.J., Zeemann P.A., Li C., Mann M., Jensen O.N., Kassem M. Differential expression profiling of membrane proteins by quantitative proteomics in a human mesenchymal stem cell line undergoing osteoblast differentiation // Stem Cells.— 2005.— Vol. 23(9).—P. 1367–1377.
- 149. Francois S., Bensidhoum M., Mouiseddine M., Mazurier C., Allenet B., Semont A., Frick J., Sache A., Bouchet S., Thierry D., et al. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage // Stem Cells.— 2006.— Vol. 24.— P. 1020–1029.

- 150. Franklin R.J., Blakemore W.F. Requirements for Schwann cell migration within CNS environments: a viewpoint. Review // Int J Dev Neurosci.—1993.—Vol. 11(5).—P. 641–649.
- 151. French A.J., Adams C.A., Anderson L.S. Fibroblasts Development of Human cloned Blastocysts Following Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) with Adult Fibroblasts // Stem Cells.—2008.—Vol. 26.—P. 485—493.
- 152. Friedenstein A.J. Stromal mechanocytes of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo // Haematol. Blood Transfus.—1980.—Vol. 25.—P. 19–29.
- 153. Friedenstein A.J. Stromal-hematopoietic interrelationships: Maximov's ideas and modern models // Haematol. Blood Transfus.—1989.— Vol. 32, № 1.— P. 59–67.
- 154. Friedenstein A.J., Chailakhjan R.K., Lalykina K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guineapig bone marrow and spleen cells // Cell Tissue Kinet.— 1970.— Vol. 3.— P. 393–403.
- 155. Friedman M.S., Long M.W., Hankenson K.D. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6 // J Cell Biochem.— 2006.— Vol. 98.— P. 538–554.
- 156. Fu Y.S., Cheng Y.C., Lin M.Y. et al. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism // Stem Cells. 2006. Vol. 24. P. 115–124.
- 157. Fuchs E., Segre J.A. Stem cells: A new lease on life // Cell.– 2000.– Vol. 100.– P. 143–155.
- 158. Fukuchi Y., Nakajima H., Sugiyama D., Hirose L., Kitamura T., Tsuji K. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem /progenitor cell potential // Stem Cells.— 2004.— Vol. 22.— P. 649—658.
- 159. Gage F.H. Neuronal stem cells: their characterization and utilization // Neurobiol Aging. 1994. Vol. 15(suppl 2). S. 191.
- 160. Gale Jr.M., Foy E.M. Evasion of intracellular host defense by hepatitis C virus // Nature. 2005. Vol. 436. P. 939–945.
- 161. Galmiche M.C., Koteliansky V.E., Briere J. et al. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway // Blood. 1993. Vol. 82. P. 66–76.

- 162. Galtrey C.M., Asher R.A., Nothias F., Fawcett J.W. Promoting plasticity in the spinal cord with chondroitinase improves functional recovery after peripheral nerve repair // Brain.— 2007.— Vol. 130(Pt 4).— P. 926–939.
- 163. Garcı'a R., Aguiar J., Alberti E., de la Cue'tara K., Pavo'n N. Bone marrow stromal cells produce nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factors // Biochem Biophys Res Commun. 2004. Vol. 316(3). P. 753–754.
- 164. Gardiner P., Beaumont E., Cormery B. Motoneurones "learn" and "forget" physical activity // Review. Can J Appl Physiol.—2005.—Vol. 30(3).—P. 352—370.
- 165. Gargett C.E. Identification and characterisation of human endometrial stem/progenitor cells // Aust N Z J Obstet Gynaecol.—2006 Jun.—Vol. 46(3).—P. 250–253.
- 166. Gargett C.E. Uterine stem cells: what is the evidence? // Hum Reprod Update. 2007. Vol. 13. P. 87–101.
- 167. Gargett C.E., Schwab K.E., Zillwood R.M., Nguyen H.P., Wu D. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium // Biol Reprod.—2009 Jun.—Vol. 80(6).—P. 1136–1145.
- 168. Gaspar C., Fodde R. APC dosage effects in tumorigenesis and stem cell differentiation // Int J Dev Biol. 2004. Vol. 48. P. 377–386.
- 169. Gersh B.J., Simari R.D., Behfar A., Terzic C.M., Terzic A. Cardiac cell repair therapy: a clinical perspective // Mayo Clin Proc.—2009.—Vol. 84.—P. 876—892.
- 170. Gerstenfeld L.C., Barnes G.L., Shea C.M., Einhorn T.A. Osteogenic differentiation is selectively promoted by morphogenetic signals from chondrocytes and synergized by a nutrient rich growth environment // Connect Tissue Res.— 2003.— Vol. 44(Suppl 1).— P. 85—91.
- 171. Gilbert S.F., Tyier A.L., Zackin E.J. Bioethics and the New Embryology: Springboards for the Debate // Sinauer Associates, Inc., MA, USA 20.–2005.
- 172. Gilbert S.F. The early development of vertebrates. In: Developmental Biology (8th Edition). // Sinauer Associates, Inc., MA,USA 353.–2006.
- 173. Gindraux F., Selmani Z., Obert L. et al. Human and rodent bone marrow mesenchymal stem cells that express primitive stem

- cell markers can be directly enriched by using the CD49a molecule // Cell Tissue Res.—2007.—Vol. 327.—P. 471–483.
- 174. Gluckman E., Broxmeyer H.A., Auerbach A.D. et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling // N.Engl.J.Med.– 1989.– Vol. 321.– P. 1174.
- 175. Goldenring J.M. The brain-life theory: towards a consistent biological definition of humanness // J Med Ethics.— 1985.— Vol. 11(4).— P. 198–204.
- 176. Gorin N.C., Piantadosi S., Stull M., Bonte H., Wingard J.R., Civin C. Increased risk of lethal graft-versus-host diseaselike syndrome after transplantation into NOD/SCID mice of human mobilized peripheral blood stem cells, as compared to bone marrow or cord blood // J Hematother Stem Cell Res.— 2002.— Vol. 11(2).— P. 277–292.
- 177. Gorlin J. Stem cell cryopreservation // J Infusional Chemother. 1996. Vol. 6. P. 23–27.
- 178. Grayson W.L., Zhao F., Izadpanah R., Bunnell B., Ma T. Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs // J Cell Physiol.— 2006.— Vol. 207.— P. 331–339.
- 179. Graziadei P.P., Monti Graziadei G.A. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. Deafferentation and reinnervation of the olfactory bulb following section of the fila olfactoria in rat // J Neurocytol.—1980.—Vol. 9(2).—P. 145–162.
- 180. Gronthos S., Simmons P.J., Graves S.E. et al. Integrinmediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix // Bone.— 2001.— Vol. 28.— P. 174–181.
- 181. Gronthos S., Zannettino A.C., Hay S.J., Shi S., Graves S.E., Kortesidis A., Simmons P.J. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow // J Cell Sci. 2003. Vol. 116. P. 1827–1835.
- 182. Guillot P.V., Gotherstrom C., Chan J., Kurata H., Fisk N.M. Hinnan first trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC //Stem Cells.—2007.—Vol. 25.—P. 646—654.
- 183. Guo T., Hebrok M. Stem cells to pancreatic beta-cells: new sources for diabetes cell therapy // Endocr Rev.— 2009, May.— Vol. 30, № 3.— P. 214–227.

- 184. Halle P., Tournilhac O., Knopinska-Posluszny W., et al. Uncontrolled-rate freezing and storage at -80°C, with only 3.5% DMSO in cryoprotective solution for 109 autologous pherpheral blood progenitor cell transplantations // Transfusion.— 2001.— Vol. 41.— P. 667–673.
- 185. Han X., Meng X., Yin Z., Rogers A., Zhong J., Rillema P., Jackson J.A., Ichim T.E., Minev B., Carrier E., Patel A.N., Murphy M.P., Min W.P., Riordan N.H. Inhibition of intracranial glioma growth by endometrial regenerative cells // Cell Cycle.— 2009, Feb 15.—Vol. 8(4).—P. 606—610.
- 186. Hardy S.A., Maltman D.J., Przyborski S.A. Mesenchymal stem cells as mediators of neural differentiation. Review // Curr Stem Cell Res Ther. 2008. Vol. 3(1). P. 43–52.
- 187. Haynesworth S.E., Baber M.A., Caplan A.I. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies // Bone.—1992.—Vol. 13.—P. 69–80.
- 188. Hemberger M., Yang W., Natale D., et al. Stem cells from fetal membranes. A Workshop Report // Placenta.— 2008.— Vol. 22.— S. 17–19.
- 189. Hermández-Navarro F., Ojeda E., Arrieta R., et al. Singlecentre experience of peripheral blood stem cell transplantation using cryopreservation by immersion in a methanol bath // Bone Marrow Transplantation.—1995.—Vol. 16.—P. 71–77.
- 190. Hida N., Nishiyama N., Miyoshi S., Kira S., Segawa K., Uyama T., Mori T., Miyado K., Ikegami Y., Cui C., Kiyono T., Kyo S., Shimizu T., Okano T., Sakamoto M., Ogawa S., Umezawa A. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells // Stem Cells.—2008.—Vol. 26.—P. 1695—1704.
- 191. Hoffmann A., Pelled G., Turgeman G., Eberle P., Zilberman Y., Shinar H., Keinan-Adamsky K., Winkel A., Shahab S., Navon G., et al. Neotendon formation induced by manipulation of the Smad8 signalling pathway in mesenchymal stem cells // J Clin Invest.—2006.—Vol. 116.—P. 940—952.
- 192. Horita Y., Honmou O., Harada K., Houkin K., Hamada H., Kocsis J.D. Intravenous administration of glial cell line-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in the adult rat // J Neurosci Res. 2006, Nov 15. Vol. 84, № 7. P. 1495–1504.

- 193. Horwitz E.M., Gordon P.L., Koo W.K. et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implication for cell therapy of bone // PNAS.—2002.—Vol. 99(13).—P. 8932.
- 194. Hwang W.S., Poh S.I., Lee B.C., et al. Patient-specific embryonic stem cells derived from SCNT blastocysts // Science.—2005.—Vol. 308.—P. 1777.
- 195. Hwang W.S., Ryu Y.J., Park J.H. et al. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from cloned blastocyst // Science. 2004. Vol. 303. P. 5664.
- 196. Ilancheran S., Michalska A., Peh G., Wallace E.M., Pera M., Manuelpillai U. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential // Biol.Reprod. 2007. Vol. 77. P. 577–588.
- 197. In't Anker P.S., Scherjon S.A., Kleijburg-van der Keur C et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta // Stem Cells. 2004. Vol. 22. P. 1338–1345.
- 198. Jabbour H.N., Kelly R.W., Fraser H.M., Critchley H.O.D. Endocrine regulation of menstruation // Endocrine Rev.— 2006.— Vol. 27.— P. 17–46.
- 199. Jaenisch R., Young R. The molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming // Cell. 2008. Vol. 132. P. 567–582.
- 200. Jendelova' P., Herynek V., Urdzı'kova' L., et al. Magnetic resonance tracking of transplanted bone marrow and embryonic stem cells labeled by iron oxide nanoparticles in rat brain and spinal cord // J Neurosci Res.—2004.—Vol. 76(2).—P. 232–243.
- 201. Jensen T.G. Cutaneous gene therapy // Ann Med. 2007. Vol. 39. P. 108–115.
- 202. Jeon E.J., Lee K.Y., Choi N.S., Lee M.H., Kim H.N., Jin Y.H., Ryoo H.M., Choi J.Y., Yoshida M., Nishino N., et al. Bone morphogenetic protein-2 stimulates Runx2 acetylation $/\!/$ J Biol Chem.– 2006.– Vol. 281.– P. 16502–16511.
- 203. Joggerst S.J., Hatzopoulos A.K. Stem cell therapy for cardiac repair: benefits and barriers // Expert Rev Mol Med.— 2009, Jul 8.— Vol. 11.— P. 20.
- 204. Jones B.J., Brooke G., Atkinson K., McTaggarr S.J. Immunosuppression by placental indoleamine 2,3-dioxygenase; a role for mesenchymal stem cells // Placenta.— 2007.— Vol. 28.— P. 1174—1181.

- 205. Jones E.A., Kinsey S.E., English A. et al. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells // Arthritis Rheum.—2002.—Vol. 46.—P. 3349—3360.
- 206. Jujo K., Ii M., Losordo D.W. Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium // J Mol Cell Cardiol. 2008, Oct. Vol. 45, № 4. P. 530–544.
- 207. Kaiserman-Abramof I.R., Padykula H.A. Angiogenesis in the postovulatory primate endometrium: the coiled arteriolar system // Anat Rec. 1989 Aug. Vol. 224(4). P. 479–489.
- 208. Karahuseyinoglou S., Cinar O., Kilic E. et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma; in situ and in vitro surveys // Stem Cells. 2007. Vol. 25. P. 319–331.
- 209. Ke Y., Chi L., Xu R., Luo C., Gozal D., Liu R. Early response of endogenous adult neural progenitor cells to acute spinal cord injury in mice // Stem Cells.— 2006.— Vol. 24(4).— P. 1011—1019.
- 210. Keating A. Mesenchymal stromal cells // Curr Opin Hematol. 2006. Vol. 13(6). P. 419–425.
- 211. Keating A. How do mesenchymal stromal cells suppress T-cells? // Cell Stem Cell. 2008. Vol. 2. P. 106–108.
- 212. Keirstead H.S. Stem cell transplantation into the central nervous system and the control of differentiation. Review // J Neurosci Res. 2001. Vol. 63(3). P. 233–236.
- 213. Keirstead H.S., Nistor G., Bernal G., et al. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury // J Neurosci. 2005. Vol. 25(19). P. 4694–4705.
- 214. Keung Y.K., Lau S., Elkayam U., Chen S.C., Dauer D. Cardiac arrhythmia after infusion of cryopreserved stem cells // Bone Marrow Transplant.— 1994.— Vol. 14.— P. 363—367.
- 215. Kiel M.J., He S., Ashkenazi R., Gentry S.N., Teta M., Kushner J.A., Jackson T.L., Morrison S.J. Haematopoietic stem cells do not asymmetrically segregate chromosomes or retain BrdU // Nature. 2007. Vol. 449. P. 238–242.
- 216. Kim D.S., Cho H.J., Choi H.R., Kwon S.B., Park K.C. Isolation of human epidermal stem cells by adherence and the reconstruction of skin equivalents // Cell Mol Life Sci.—2004.— Vol. 61.—P. 2774—2781.
- 217. Kim H., Kim S.W., Nam D., Kim S., Yoon Y.S. Cell therapy with bone marrow cells for myocardial regeneration // Antioxid

- Redox Signal. 2009, Aug. Vol. 11, № 8. P. 1897–1911.
- 218. Kim J., Lee Y., Kim H. et al. Human animotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells // Cell Protif.— 2007.— Vol. 40.— P. 75—90.
- 219. Kim J.S., Romero R., Tarca A. et al. Gene expression profiling demonstrates a novel role for fetal fibrocytes and the umbilical vessels in human fetoplacental development // J.Cell.Mol. Med.—2008.—Vol. 12.—P. 1317–1330.
- 220. Kim S.I., Song C.H., Sung H.J. et al. Human placentaderived feeders support prolonged undifferenriated propagation of a human embryonic stem cell line- SNUhES3: comparison with human bone marrow-derived feeders // Sum Cells Dev.— 2007.— Vol. 16.— P. 421–428.
- 221. Kim Y.J., Yu J.M., Joo H.J., Kim H.K., Cho H.H., Bae Y.C., Jung J.S. Role of CD9 in proliferation and proangiogenic action of human adipose-derived mesenchymal stem cells // Pflugers Arch.– 2007, Aug 1.
- 222. Kinoshita T., Miyajima A. Cytokineregulationofliverdevelopment // BiochimBiophysActa. 2002, Nov 11. Vol. 1592, № 3. P. 303–312.
- 223. Kissel C.K., Lehmann R., Assmus B. et al. Selective functional exhaustion of hematopoietic progenitor cells in the bone marrow of patients with postinfarction heart failure // J Am Coll Cardiol. 2007. Vol. 49. P. 2341–2349.
- 224. Klimanskaya I., Rosenthal N., Lanza R. Derive and conquer: sourcing and differentiating seem cells for therapeutic applications // Nat. Rev. Drug Discov. 2008. Vol. 7. P. 131–142.
- 225. Kocher A.A., Schuster M.D., Szabolcs M.J., Takuma S., Burkhoff D., Wang J., Homma S., Edwards N.M., Itescu S. Neovas-cularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function // Nat Med.— 2001.— Vol. 7.— P. 430–436.
- 226. Kohyama J., Abe H., Shimazaki T., et al. Brain from bone: Efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent // Differentiation.—2001.—Vol. 68(4–5).—P. 235–244.
- 227. Kolambkar Y.M., Peister A., Soker S., Atala A., Guldberg R.E. Chondrogenic differentiation of amniotic fluid-derived stem cells // J.Mol.Histol. 2007. Vol. 38. P. 405–413.

- 228. Kucia M., Reca R., Campbell F.R. et al. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow // Leukemia. 2006. Vol. 20. P. 857–869.
- 229. Kucia M., Wysoczynski M., Wu W., Zuba-Surma E., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. Evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood // Stem Cells.—2008.—Vol. 26.—P. 2083—2092.
- 230. Kung J.W., Currie I.S., Forbes S.J., Ross J.A. Liver development, regeneration, and carcinogenesis // J Biomed Biotechnol.—2010.—Vol. 98.— P. 42–48.
- 231. Kunisaki S.M., Armant M., Kao G.S., Stevenson K., Kirn H., Fauza D.O. Tissue engineering from human mesenchymal amniocytes; a prelude to clinical trials // J. Pediatr, Surg.— 2007.— Vol. 42.— P. 974—980.
- 232. Kupatt C., Hinkel R., von Brühl M-L. et al. Endothelial nitric oxide synthase overexpression provides a functionally relevant angiogenic switch in hibernating pig myocardium // J Am Coll Cardiol.—2007.—Vol. 49.—P. 1575—1584.
- 233. Labouyrie E., Dubus P., Groppi A., et al. Expression of neurotrophins and their receptors in human bone marrow // Am J Pathol.– 1999.– Vol. 154(2).– P. 405–415.
- 234. Lang I., Schweizer A., Hidden U. et al. Human fetal placenta endothelial cells have a mature arterial and a juvenile venous phenotype with adipogenic and osteogenic differentiation potential // Differentiation.—2008.—Vol. 76.—P. 1031–1043.
- 235. Lange C., Bassler P., Lioznov M.V., Bruns H., Kluth D., Zander A.R., Fiegel H.C. Liver-specific gene expression in mesenchymal stem cells is induced by liver cells // World J Gastroenterol.—2005.—Vol. 11.—P. 4497—4504.
- 236. Langton A.K., Herrick S.E., Headon D.J. An extended epidermal response heals cutaneous wounds in the absence of a hair follicle stem cell contribution // J Invest Dermatol.— 2008.— Vol. 128.—P. 1311–1318.
- 237. Larcher F., Dellambra E., Rico L., Bondanza S., Murillas R., Cattoglio C., Mavilio F., Jorcano J.L., Zambruno G., Del Rio M. Long-term engraftment of single genetically modified human epidermal holoclones enables safety pre-assessment of cutaneous gene therapy // Mol Ther. 2007. Vol. 15. P. 1670–1676.

- 238. Lazaro C.A., Chang M., Tang W., Campbell J., Sullivan D.G., Gretch D.A., Corey W., RW Coombs, and Nelson Fausto HCV Replication in Human Hepatocytes // AJP February.— 2007.— Vol. 170, № 2.— P. 478—489.
- 239. Le Blanc K., Tammik C., Rosendahl K. et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells // Exp Hematol.— 2003.— Vol. 31.— P. 890–896.
- 240. Lee D.D., Grossman E., Chong A.S. Cellular therapies for type 1 diabetes // Horm Metab Res. 2008, Feb. Vol. 40, № 2. P. 147–154.
- 241. Lee H., Shamy G.A., Elkabetz Y., et al. Directed differentiation and transplantation of human embryonic stem cell derived motoneurons // Stem Cells.—2007.—Vol. 25(8).—P. 1931–1939.
- 242. Lee J., Kuroda S., Shichinohe H., et al. Migration and differentiation of nuclear fluorescence-labeled bone marrow stromal cells after transplantation into cerebral infarct and spinal cord injury in mice // Neuropathology.— 2003.— Vol. 23(3).— P. 169–180.
- 243. Lee K.H., Suh-Kim H., Choi J.S., Jeun S.S., Kim E.J., Kim S.S., Yoon do H., Lee B.H. Human mesenchymal stem cell transplantation promotes functional recovery following acute spinal cord injury in rats // Acta Neurobiol Exp (Wars). 2007. Vol. 67, № 1. P. 13–22.
- 244. Levicar N., Dimarakis I., Flores C., Tracey J., Gordon M.Y., Habib N.A. Stem cells as a treatment for chronic liver disease and diabetes // Handb Exp Pharmacol.— 2007.— Vol. 180.— P. 243—262.
- 245. Levy V., Lindon C., Zheng Y., Harfe B.D., Morgan B.A. Epidermal stem cells arise from the hair follicle after wounding // FASEB J.–2007.– Vol. 21.– P. 1358–1366.
- 246. Li A., Simmons P.J., Kaur P. Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype // Proc Natl Acad Sci USA.—1998.—Vol. 95.—P. 3902—3907.
- 247. Li C., Zhang W., Jiang X., Mao N. Human placenta-derived mesenchymal stem cells inhibit proliferation and function of allogeneic immune cells // Cell Tissue Res.— 2007.— Vol. 330.— P. 437–446.
- 248. Li D., Wang G.Y., Dong B.H., Zhang Y.C., Wang Y.X., Sun B.C. Biological characteristics of human placental mesenchymal

- stem cells and their proliferalive response to various cyrokines // Cells Tissue Organs.— 2007.— Vol. 186.— P. 169–179.
- 249. Li H., Yu B., Zhang Y., Pan Z., Xu W., Li H. Jagged1 protein enhances the differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes // Biochem Biophys Res Commun.— 2006.— Vol. 341.— P. 320–325.
- 250. Li L., Xie T. Stem cell niche: structure and function // Annu Rev Cell Dev Biol. 2005. Vol. 21. P. 605–631.
- 251. Li X.J., Du Z.W., Zarnowska E.D., et al. Specification of motoneurons from human embryonic stem cells // Nat Biotechnol.—2005.—Vol. 23(2).—P. 215–221.
- 252. Lim P.A., Tow A.M. Recovery and regeneration after spinal cord injury: a review and summary of recent literature // Ann Acad Med Singapore. 2007, Jan. Vol. 36, № 1. P. 49–57.
- 253. Lin K.K., Goodell M.A. Purification of hematopoietic stem cells using the side population // Methods Enzymol.— 2006.— Vol. 420.— P. 255–264.
- 254. Lipinski M.J., Biondi-Zoccai G.G.L., Abbate A., et al. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials // J Am Coll Cardiol.—2007.—Vol. 50.—P. 1761—1767.
- 255. Liu S., Qu Y., Stewart T.J., et al. Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation // Proc Natl Acad Sci USA.— 2000.— Vol. 97(11).—P. 6126–6131.
- 256. Llado' J., Haenggeli C., Maragakis N.J., Snyder E.Y., Rothstein J.D. Neural stem cells protect against glutamate-induced excitotoxicity and promote survival of injured motor neurons through the secretion of neurotrophic factors // Mol Cell Neurosci.— 2004.—Vol. 27(3).—P. 322–331.
- 257. Lois C., Alvarez-Buylla A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia // Proc Natl Acad Sci USA.—1993.—Vol. 90(5).—P. 2074—2077.
- 258. Lorenzini S., Andreone P. Regenerative medicine and liver injury: what role for bone marrow derived stem cells? // Curr Stem Cell Res Ther. 2007, Jan. Vol. 2, № 1. P. 83–88.

- 259. Lovelock J.E., Bishop M.W. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide // Nature.— 1959.— Vol. 183.—P. 1394—1395.
- 260. Lowry W.E., Richter L., Yachechko R., et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts // Proc Natl Acad Sci USA.–2008.–Vol. 105(8).–P. 2883–2888.
- 261. Lu P., Jones L.L., Snyder E.Y., Tuszynski M.H. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury // Exp Neurol.—2003.—Vol. 181(2).—P. 115—129.
- 262. Mahmood A., Lu D., Chopp M. Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury // J Neurotrauma.— 2004.— Vol. 21(1).—P. 33—39.
- 263. Makino S., Fukuda K., Miyoshi S., et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro // J Clin Invest.—1999.—Vol. 103(5).—P. 697—705.
- 264. Makino S., Harada M., Akashi K., et al. A simplified method for cryopreservation of peripheral blood stem cells at -80°C without rate-controlled freezing // Bone Marrow Transplantation.—1991.—Vol. 2.—P. 239–244.
- 265. Mao J.L., Kurman R.J., Huang C.C., Lin M.C., Shih I.E.M. Immuiiohistochemistry of choriocarcinoma: an aid in differential diagnosis and in elucidating pathogenesis // Am.J.Surg.Pathol.—2007.—Vol. 31.—P. 1726–1732.
- 266. Marcus A.J., Coyne T.M., Ranch J., Woodbury D., Black I.B. Isolation, characterization and differentiation of stem cells derived from the rat amniotic membrane // Differentiation.— 2008.—Vol. 76.—P. 130—144.
- 267. Martens D.J., Seaberg R.M., van der Kooy D. In vivo infusions of exogenous growth factors into the fourth ventricle of the adult mouse brain increase the proliferation of neural progenitors around the fourth ventricle and the central canal of the spinal cord // Eur J Neurosci.—2002.—Vol. 16(6).—P. 1045–1057.
- 268. Martinez-Fernandez A., Nelson T.J., Yamada S., et al. iPS programmed without c-MYC yield proficient cardiogenesis for functional heart chimerism // Circ Res. 2009. Vol. 105. P. 648–656.
- 269. Martino M., Morabito F., Messina G., Irrera G., Pucci G., Iacopino P. Fractionated infusions of cryopreserved stem cells may

- prevent DMSO-induced major cardiac complications in graft recipients // Haematologica.— 1996.— Vol. 81.— P. 59—61.
- 270. Massague J., Blain S.W., Lo R.S. TGF β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders // Cell.— 2000.— Vol. 103.— P. 295–309.
- 271. Mathews D.J., Sugarman J., Bok H., et al. Cell-based interventions for neurologic conditions. Ethical challenges for early human trials // Neurology. 2008. Vol. 71(4). P. 288–293.
- 272. Matthai C., Horvat R., Noe M., Nagele F., Radjabi A., van Trotsenburg M., Huber J., Kolbus A. Oct-4 expression in human endometrium // Mol Hum Reprod. 2006 Jan. Vol. 12(1). P. 7–10.
- 273. Mayer-Proschel M., Kalyani A.J., Mujtaba T., Rao M.S. Isolation of lineage-restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells // Neuron.—1997.—Vol. 19(4).—P. 773—785.
- 274. Mazur P. Cryobiology: The freezing of biological systems // Science. 1977. Vol. 168. P. 939–949.
- 275. Mazurier F., Doedens M., Gan O.I. Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells // Nat. Med.— 2003.— Vol. 9.— P. 953–963.
- 276. McDonald J.W., Liu X.Z., Qu Y., et al. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord // Nat Med. 1999. Vol. 5(12). P. 1410–1412.
- 277. McKay J.S., Blakemore W.F., Franklin R.J. The effects of the growth factor-antagonist, trapidil, on remyelination in the CNS // Neuropathol Appl Neurobiol.—1997.—Vol. 23(1).—P. 50–58.
- 278. McLennan C.E., Rydell A.H. Extent of endometrial shedding during normal menstruation // Obst. et Gynecol.— 1965.— Vol. 26.— P. 605–621.
- 279. McNiece I.K., Almeida-Parada G., Shpall E.J. Ex vivo expanded cord blood cells provide rapid engraftment in fetal sheep but lack long-term engrafting potential // Exp. Hematol.— 2002.— Vol. 30.— P. 612–616.
- 280. Mead J.E., Fausto N. Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism // Proc Natl Acad Sci USA.—1989.— Vol. 86.—P. 1558—1562.
- 281. Menasche P., Hagege A.A., Scorsin M. et al. Myoblast transplantation for heart failure // Lancet. 2001. Vol. 357(9252). P. 279.

- 282. Meng X., Ichim T.E., Zhong J., Rogers A., Yin Z., Jackson J., Wang H., Ge W., Bogin V., Chan K.W., Thébaud B., Riordan N.H. Endometrial regenerative cells: A novel stem cell population // Journal of Translational Medicine. 2007. Vol. 5. P. 57.
- 283. Messina E., De Angelis L., Frati G., et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart // Circ Res. 2004. Vol. 95. P. 911–921.
- 284. Metcalfe A.D., Ferguson M.W. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration // J R Soc Interface.—2007.—Vol. 4.—P. 413—437.
- 285. Meuli M., Raghunath M. Burns. Part 2. Tops and flops using cultured epithelial auto-grafts in children // Pediatr Surg Int.—1997.—Vol. 12.—P. 471—477.
- 286. Mezey E., Chandross K.J., Harta G., Maki R.A., McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow // Science.— 2000.— Vol. 290(5497).—P. 1779–1180.
- 287. Miao Z., Jin J., Chen L. et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells // Cell Biol.Int.—2006.—Vol. 30.—P. 681–687.
- 288. Miki T., Mitamura K., Ross M.A., Stolz D.B., Strom S.C. Idenrification of stem cell marker-positive cells by immunofluoresence in term human amnion // J.Reprod.Immunol.— 2007.— Vol. 75.—P. 91–96.
- 289. Miki T., Strom S.C. Amnion-derived pluripotent/ multipolent stem cells // Stem Cell Rev. 2006. Vol. 2. P. 133–142.
- 290. Mitchell C., Nivison M., Jackson L.F., Fox R., Lee D.C., Campbell J.S., Fausto N. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor links hepatocyte priming with cell cycle progression during liver regeneration // J Biol Chem.— 2004.— Vol. 280.— P. 2562–2568.
- 291. Mitchell K.E., Weiss M.L., Mitchell B.M. et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia // Stem Cells.—2003.—Vol. 21.—P. 50–60.
- 292. Mito M., Kusano M., Kawaura Y. Hepatocyte transplantation in man // Transplant.Proc.—1992.—Vol. 24.—P. 3052.
- 293. Mothe A.J., Tator C.H. Proliferation, migration, and differentiation of endogenous ependymal region stem/progenitor cells

- following minimal spinal cord injury in the adult rat // Neuroscience. 2005. Vol. 131(1). P. 177–187.
- 294. Murry C.E., Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development // Cell. 2008. Vol. 132(4). P. 661–680.
- 295. Nagy A., Rossant J., Nagy R., Abramow-Newerly W., Roder J.C. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells // Proc Natl Acad Sci USA.—1993.—Vol. 90(18).—P. 8424—8428.
- 296. Nakano M., Satoh K., Fukumoto Y., Ito Y., Kagaya Y., Ishii N., Sugamura K., Shimokawa H. Important role of erythropoietin receptor to promote VEGF expression and angiogenesis in peripheral ischemia in mice // Circ Res. 2007, Mar 16. Vol. 100, № 5. P. 662–669.
- 297. Nandoe Tewarie R.D., Hurtado A., Levi A.D., Grotenhuis J.A., Oudega M. Bone marrow stromal cells for repair of the spinal cord: towards clinical application // Cell Transplant.— 2006.— Vol. 15(7).— P. 563–577.
- 298. Nelson T.J., Martinez-Fernandez A., Yamada S., Perez-Terzic C., Ikeda Y., Terzic A. Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells // Circulation.—2009.—Vol. 120.—P. 408—416.
- 299. Nistor G.I., Totoiu M.O., Haque N., Carpenter M.K., Keirstead H.S. Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation // Glia. 2005. Vol. 49(3). P. 385–396.
- 300. Noguchi H. Stem cells for the treatment of diabetes // Endocr J. -2007, Feb. Vol. 54, N 1. P. 7–16.
- 301. Nunes M.C., Roy N.S., Keyoung H.M., et al. Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain // Nat Med.— 2003.— Vol. 9(4).— P. 439–447.
- 302. Nussbaum J., Minami E., Laflamme M.A., et al. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response // FASEB J.– 2007.– Vol. 21(7).– P. 1345–1357.
- 303. Nuttall M.E., Gimble J.M. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications // Curr Opin Pharmacol.—2004.—Vol. 4.—P. 290—294.

- 304. Obermair F.J., Schröter A., Thallmair M. Endogenous neural progenitor cells as therapeutic target after spinal cord injury // Physiology (Bethesda). 2008, Oct. Vol. 23. P. 296–304.
- 305. Ogawa S., Miyagawa S. Potentials of regenerative medicine for liver disease // Surg Today.— 2009.— Vol. 39, № 12.— P. 1019–1025.
- 306. Oh H., Bradfute S.B., Gallardo T.D., et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction // Proc Natl Acad Sci USA.— 2003.— Vol. 100.—P. 12313—12318.
- 307. Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. Generation of germ-linecompetent induced pluripotent stem cells // Nature.— 2007.— Vol. 448(7151).— P. 313–317.
- 308. Okulicz W.C., Ace C.I., Scarrell R. Zonal changes in proliferation in the rhesus endometrium during the late secretory phase and menses // Proc Soc Exp Biol Med.—1997 Feb.—Vol. 214(2).—P. 132–138.
- 309. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Bodine D.M., Leri A., Anversa P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice // Ann Acad Sci.—2001, Jun.—Vol. 938.—P. 221—229.
- 310. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S.M., Li B., Pickel J., McKay R., Nadal-Ginard B., Bodine D.M., Leri A., Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium // Nature.— 2001.— Vol. 410.— P. 701—705.
- 311. Otsu K., Das S., Houser S.D., Quadri S.K., Bhattacharya S., Bhattacharya J. Concentration dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells // Blood. 2009. Vol. 113. P. 4197-4205.
- 312. Padykula H.A. Regeneration in the primate uterus: the role of stem cells // Ann N Y Acad Sci. 1991. Vol. 622. P. 47–56.
- 313. Padykula H.A., Coles L.G., McCracken J.A., King N.W.Jr, Longcope C., Kaiserman-Abramof I.R. A zonal pattern of cell proliferation and differentiation in the rhesus endometrium during the estrogen surge // Biol Reprod.—1984 Dec.—Vol. 31(5).—P. 1103–1118.
- 314. Padykula H.A., Coles L.G., Okulicz W.C., Rapaport S.I., McCracken J.A., King N.W.Jr, Longcope C., Kaiserman-Abramof I.R. The basalis of the primate endometrium: a bifunctional germinal compartment // Biol Reprod. 1989 Mar. Vol. 40(3). Vol. 681–690.

- 315. Pan H.C., Yang D.Y., Chiu Y.T. et al. Enhanced regeneration in injured sciatic nerve by human amniotic mesenchymal stem cell // J. Clin.Neurosci. 2006. Vol. 13. P. 570–575.
- 316. Park I.H., Zhao R., West J.A., et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors // Nature.—2008.—Vol. 451(7175).—P. 141–146.
- 317. Park Y.B., Kim Y.Y., Oh S.K., et al. Alterations of proliferative and differentiation potentials of human embryonic stem cells during long-term culture // Exp Mol Med. 2008. Vol. 40(1). P. 98–108.
- 318. Parmacek M.S. Cardiac stem cells and progenitors: developmental biology and therapeutic challenges // Trans Am Clin Climatol Assoc.—2006.—Vol. 117.—P. 239–255.
- 319. Parolini O., Alviano F., Bagnara G.P. et al. Isolation and characterization of cells from human term placenta; outcome of the First International Workshop on Placenta-Derived Stem Cells // Stem Cells. 2008. Vol. 26. P. 300–311.
- 320. Parr A.M., Kulbatski I., Tator C.H. Transplantation of adult rat spinal cord stem/progenitor cells for spinal cord injury // J Neurotrauma. 2007. Vol. 24(5). P. 835–845.
- 321. Patel A.N., Park E., Kuzman M., Benetti F., Silva F.J., Allickson J.G. Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation // Cell Transpl.— 2008.—Vol. 17.—P. 303—311.
- 322. Peddiaditakis P., Lopes-Talavera J.C., Petersen B., Monga S.P., Michalopoulos G.K. The processing and utilization of hepatocyte growth factor/scatter factor following partial hepatectomy in the rat // Hepatology. 2001. Vol. 34(4 Pt1). P. 688–693.
- 323. Peister A., Mellad J.A., Larson B.L. et al. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential // Blood. 2004. Vol. 103. P. 1662–1668.
- 324. Pellegrini G., Ranno R., Stracuzzi G., Bondanza S., Guerra L., Zambruno G., Micali G., De Luca M. The control of epidermal stem cells (holoclones) in the treatment of massive full-thickness burns with autologous keratinocytes cultured on fibrin // Transplantation.—1999.—Vol. 68.—P. 868—879.
- 325. Penn M.S., Mangi A.A. Genetic enhancement of stem cell engraftment, survival, and efficacy // Circ Res. 2008. Vol. 102. P. 1471–1482.

- 326. Perin L., Sedrakyan S., Da Sacco S., De Filippo R. Characterization of human amniotic fluid, stem cells and their pluripotential capacity // Methods Celt Biol. 2008. Vol. 86. P. 85–99.
- 327. Peterfy A. Fetal viability as a threshold to personhood. A legal analysis // J Leg Med. 1995. Vol. 16(4). P. 607–636.
- 328. Petersen B.E., Bowen W.C., Patrene K.D., et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells // Science.— 1999.— Vol. 284(5417).—P. 1168—1170.
- 329. Pfeifer K., Vroemen M., Blesch A., Weidner N. Adult neural progenitor cells provide a permissive guiding substrate for corticospinal axon growth following spinal cord injury // Eur J Neurosci.—2004.—Vol. 20(7).—P. 1695—1704.
- 330. Pittenger M.F. Mesenchymal stem cells from adult bone marrow // Methods Mol Biol. 2008. Vol. 449. P. 27–44.
- 331. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // Science.—1999.—Vol. 284.—P. 143–147.
- 332. Pittenger M.F., Martin B.J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics // Circ Res. 2004. Vol. 95. P. 9–20.
- 333. Polak J.M., Bishop A.E. Stem cells and tissue engineering: past, present, and future // Ann N Y Acad Sci. 2006, Apr. Vol. 1068. P. 352–366.
- 334. Portmann-Lanz C.B., Schoeberlein A., Huber A. et al. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for preand perinatal neuroregeneration // Am.J.Obstet. Gynecol.— 2006.— Vol. 194.—P. 664—673.
- 335. Prather W.R., Toren A., Meiron M. Placental-derived and expanded mesenchymal stromal cells (PLX-I) to enhance the engrafiment of hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood // Expert Opin, Biol. Ther.—2008.—Vol. 8.—P. 1241—1250.
- 336. Prianishnikov V.A. Functional-morphological model of organization of the epithelium of normal, hyperplastic and neoplastic human endometrium // Arkh Patol.—1979.—Vol. 41(1).—P. 60–66.
- 337. Prusa A.R., Marton E., Rosner M. et al. Neurogenic cells in human amniotic fluid // Am.J.Obstet. Gynecol. 2004. Vol. 191. P. 309–314.
- 338. Prusa A.R., Marton E., Rosner M., Bernaschek G., Hengstschläger M. Oct-4 expressing cells in human amniotic fluid: a

- new source tor stern cell research? // Hum. Reprod.— 2003.— Vol. 18.— P. 1489—1493.
- 339. Raisman G., Li Y. Repair of neural pathways by olfactory ensheathing cells // Nat Rev Neurosci. 2007. Vol. 8(4). P. 312–319.
- 340. Rakic P. Limits of neurogenesis in primates // Science.—1985.—Vol. 227(4690).—P. 1054–1056.
- 341. Ramon-Cueto A. Olfactory ensheathing glia transplantation into the injured spinal cord // Prog Brain Res. 2000. Vol. 128. P. 265–272.
- 342. Raper S.E., Grossman M., Rader D.J., et al. Safety and feasibility of liver directed ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolemia // Ann. Surg.—1996.—Vol. 223.—P. 116.
- 343. Ratajczak M.Z., Kucia M., Ratajczak J., Zuba-Surma E.K. A multi-instrumental approach to identify and purify very small embryonic like stem cells (VSELs) from adult tissues // Micron.—2009.—Vol. 40.—P. 386—393.
- 344. Ratajczak M.Z., Machalinski B., Wojakowski W., Ratajczak J., Kucia M. A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4(+) stem cells in adult bone marrow and other tissues // Leukemia. 2007. Vol. 21. P. 860–867.
- 345. Ratajczak M.Z., Zuba-Surma E.K., Machalinski B., Ratajczak J., Kucia M. Very small embryonic-like (VSEL) stem cells: purification from adult organs, characterization, and biological significance // Stem Cell Rev. 2008. Vol. 4. P. 89–99.
- 346. Ratajczak M.Z., Zuba-Surma E.K., Wysoczynski M., et al. Hunt for pluripotent stem cell–regenerative medicine search for almighty cell // J Autoimmun.—2008.—Vol. 30.—P. 151–162.
- 347. Ray S., Atkuri K.R., Deb-Basu D., et al. MYC can induce DNA breaks in vivo and in vitro independent of reactive oxygen species // Cancer Res. 2006. Vol. 66(13). P. 6598–6605.
- 348. Reinecke H., Minami E., Zhu W.Z., Laflamme M.A. Cardiogenic differentiation and transdifferentiation of progenitor cells // Circ Res. 2008, Nov 7. Vol. 103, № 10. P. 1058–1071.
- 349. Reinisch A., Bartmann C., Rohde E. et al. Humanized system to propagate cord blood-derived multipotent mesenchyimal stromal cells for clinical application // Regen.Med. 2008. Vol. 2. P. 371–382.
- 350. Reubinoff B.E., Pera M.F., Fong C.Y., Trounson A., Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro // Nat. Biotechnol.—2000.—Vol. 18.—P. 399.

- 351. Rhodes K.E., Gekas C., Wang Y. et al. The emergence of hematopoietic stem cells is initiated in the placental vascularure in the absence of circulation // Cell Stem Cell. 2008. Vol. 2. P. 252–263.
- 352. Robertson J.A. Ethics and policy in embryonic stem cell research // Kennedy Inst Ethics J.—1999.— Vol. 9(2).—P. 109–136.
- 353. Roche E., Enseñat-Waser R., Reig J.A., Jones J., León-Quinto T., Soria B. Therapeutic potential of stem cells in diabetes // Handb Exp Pharmacol. 2006. Vol. 174. P. 147–167.
- 354. Roman Catholic Church. Catechism of the Catholic Church. 2nd English translation. Vatican City: Libreria Editrice Vaticana; 1994.
- 355. Rossant J. Stem cells and early lineage development // Cell.–2008.–Vol. 132.–P. 527–531.
- 356. Roth E., Taylor H.B. Heterotopic cartilage in the uterus // Obstet Gynecol. 1966 Jun. Vol. 27(6). P. 838–844.
- 357. Roubelakis M.G., Pappa K.I., BitsikaV., et al. Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells // Stem Cells Dev.—2007.—Vol. 16.—P. 931—952.
- 358. Rowley S.D. Hematopoietic stem cell cryopreservation: a review of current techniques // J Hematotherapy.— 1992.— Vol. 1.— P. 233—250.
- 359. Sackstein R. Expression of an L-selectin ligand on hematopoietic progenitor cells // Acta Haematol.—1997.—Vol. 97.—P. 22—28.
- 360. Saito T., Kuang J.Q., Lin C.C., Chiu R.C. Transcoronary implantation of bone marrow stromal cells ameliorates cardiac function after myocardial infarction // J Thorac Cardiovasc Surg.—2003.—Vol. 126(1).—P. 114–123.
- 361. Sanchez-Ramos J., Song S., Cardozo-Pelaez F., et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro // Exp Neurol. 2000. Vol. 164(2). P. 247–256.
- 362. Santa Maria L., Rojas C.V., Minguell J.J. Signals from damaged but not undamaged skeletal muscle induce myogenic differentiation of rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells // Exp Cell Res. 2004. Vol. 300. P. 418–426.
- 363. Sartore S., Lenzi M., Angelini A. et al. Amniotic mesenchymal cells autotransplanted in a porcine model of cardiac ischemia do not differentiate to cardiogenic phenotypes // Eur. J. Caridiothorac. Surg.–2005.– Vol. 28.– P. 677–684.

- 364. Sarugaser R., Lickorish D., Baksh D., Hosseini M.M., Davies J.E. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors // Stem Cells.— 2005.— Vol. 23.—P. 220–229.
- 365. Sasaki K., Heeschen C., Aicher A. et al. Ex vivo pretreatment of bone marrow mononuclear cells with endothelial NO synthase enhancer AVE9488 enhances their functional activity for cell therapy // Proc Natl Acad Sci USA.— 2006.— Vol. 103.— P. 14537—14541.
- 366. Schlesinger N. Purine-richfoodsandtheriskofgout in men // N Engl J Med. 2004, Jun 10. Vol. 350, № 24. P. 2520–2521.
- 367. Schmidt D., Achermann J., Odermarr B. et al. Prenatally fabricated autologous human living heart valves based on amniotic fluid-derived progenitor cells as single cell source // Circulation.—2007.—Vol. 116.—S. 64—70.
- 368. Schmidt D., Mol A., Breymann C. et al. Living autologous heart valves engineered from human prenatally harvested progenitors // Circulation.—2006.—Vol. 114.—S. 125–131.
- 369. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell // Blood Cells.— 1978.— Vol. 4.— P. 7–25.
- 370. Schwab K.E., Chan R.W.S., Gargett C.E. Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle // Fert. and Steril. 2005. Vol. 84(2). P. 1124–1130.
- 371. Sell S. Stem Cells Handbook. Totowa, NJ: Humana Press; 2004.
- 372. Sessarego N., Parodi A., Podesta M. et al. Multipotent mesenchymal stromal cells from amniotic fluid: solid perspectives for clinical application // Haematologica. 2008. Vol. 93. P. 339–346.
- 373. Setoguchi T., Nakashima K., Takizawa T., et al. Treatment of spinal cord injury by transplantation of fetal neural precursor cells engineered to express BMP inhibitor // Exp Neurol.— 2004.— Vol. 189(1).—P. 33—44.
- 374. Shi S., Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp // J Bone Miner Res. 2003. Vol. 18. P. 696–704.
- 375. Shindo T., Matsumoto Y., Wang Q., Kawai N., Tamiya T., Nagao S. Differences in the neuronal stem cells survival, neuronal differentiation and neurological improvement after transplantation of neural stem cells between mild and severe experimental traumatic

- brain injury // J Med Invest.— 2006, Feb.— Vol. 53, № 1.— P. 242—251
- 376. Shiras A., Chettiar S.T., Shepal V., Rajendran G., Prasad G.R., Shastry P. Spontaneous transformation of human adult nontumorigenic stem cells to cancer stem cells is driven by genomic instability in a human model of glioblastoma // Stem Cells.— 2007.— Vol. 25(6).— P. 1478–1489.
- 377. Silva Meirelles L., Chagastelles P.C., Nardi N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. // J Cell Sci. 2006. Vol. 119. P. 2204–2213.
- 378. Silver J., Millet J.H. Regeneration beyond the glial scar // Nat Rev Neurosci. 2004. Vol. 5(2). P. 146–156.
- 379. Simmons P.J., Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1 // Blood.— 1991.— Vol. 78.— P. 55—62.
- 380. Smith R.R., Barile L., Cho H.C., et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens // Circulation.— 2007.— Vol. 115.— P. 896—908.
- 381. Snyder E.Y, Macklis J.D. Multipotent neural progenitor or stem-like cells may be uniquely suited for therapy for some neurodegenerative conditions // Clin Neurosci.—1995.—Vol. 3(5).—P. 310–316.
- 382. Snyder E.Y. Neural transplantation: an approach to cellular plasticity in the developing central nervous system. Review // Semin Perinatol.—1992.—Vol. 16(2).—P. 106—121.
- 383. Song W.J., Shah R., Hussain M.A. The use of animal models to study stem cell therapies for diabetes mellitus // ILAR J.–2009.– Vol. 51, № 1.– P. 74–81.
- 384. Sordi V., Malosio M.L., Marchesi F. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets // Blood. 2005. Vol. 106. P. 419–427.
- 385. Soupene E., Serikov V., Kuypers F.A. Characterization of an acyl-coenzyme A binding protein predominantly expressed in human primitive progenitor cells // Lipid Res. 2008. Vol. 49. P. 1103–1112.
- 386. Spencer J.A., Hacker S.L., Davis E.C., Mecham R.P., Knutsen R.H., Li D.Y., Gerard R.D., Richardson J.A., Olson E.N., Yanagisawa H. Altered vascular remodeling in fibulin-5-deficient mice reveals a role of fibulin-5 in smooth muscle cell proliferation

- and migration // Proc Natl Acad Sci USA.— 2005, Feb 22.— Vol. 102(8).— P. 2946—2951.
- 387. Sputtek A., Jetter S., Hummel K., Kühnl P. Cryopreservation of peripheral blood progenitor cells: Characteristics of suitable techniques // Beitr Infusionsther Transfusionsmed.— 1997.— Vol. 34.— P. 79–83.
- 388. Sputtek A., Köber C. Cryopreservation of red blood cells, platelets, lymphocytes, and stem cells. Clinical Application of Cryobiology / Eds: Fuller B.J., Grout BWW. CRC Press, Boca Raton, 1991.– P. 95–147.
- 389. Spyridopoulos I., Erben Y., Brummendorf T.H. et al. Telomere gap between granulocytes and lymphocytes is a determinant for hematopoetic progenitor cell impairment in patients with previous myocardial infarction // Arterioscler Thromb Vasc Biol.—2008.—Vol. 28.—P. 968—974.
- 390. Spyridopoulos I., Hoffmann J., Aicher A. et al. Accelerated telomere shortening in leukocyte subpopulations of patients with coronary heart disease. Role of cytomegalovirus seropositivity // Circulation.—2009.—Vol. 120.—P. 1364—1372.
- 391. Srivastava A.S., Malhotra R., Sharp J., Berggren T. Potentials of ES cell therapy in neurodegenerative diseases // Curr Pharm Des. 2008. Vol. 14, № 36. P. 3873–3879.
- 392. Srivastava M.V. Restorative therapy in stroke using stem cells // Neurol India. 2009, Jul-Aug. Vol. 57, № 4. P. 381–386.
- 393. Stier S., Cheng T., Dombkowski D. Notch-1 activation increases hemopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome // Blood.— 2002.— Vol. 99.— P. 2369–2378.
- 394. Strakova Z., Livak M., Krezaiek M., Ihnatovych I. Multipotent properties of myofibroblasts cells derived from human placenta // Cell Tissue Res. 2008. Vol. 332. P. 479–488.
- 395. Sugaya K. Possible use of autologous stem cell therapies for Alzheimer's disease // Curr Alzheimer Res. 2005. Vol. 2(3). P. 367–376.
- 396. Sutherland H.J., Eaves C.J., Eaves A.C., Dragowska W., Lansdorp P.M. Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long term hematopoiesis in vitro // Blood.—1989.—Vol. 74.—P. 1563.

- 397. Syková E., Jendelová P. Migration, fate and in vivo imaging of adult stem cells in the CNS // Cell Death Differ. 2007, Jul. Vol. 14, № 7. P. 1336–1342.
- 398. Tabibzadeh S. Human endometrium: an active site of cytokine production and action // Endocr Rev. 1991, Aug. Vol. 12(3). P. 272–290.
- 399. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // Cell. 2006. Vol. 126(4). P. 663–676.
- 400. Takami T., Oudega M., Bates M.L., Wood P.M., Kleitman N., Bunge M.B. Schwann cell but not olfactory ensheathing glia transplants improve hindlimb locomotor performance in the moderately contused adult rat thoracic spinal cord // J Neurosci.— 2002.—Vol. 22(15).—P. 6670–6681.
- 401. Tamagawa T., Oi S., Ishiwata I., Ishikawa H., Nakamura Y. Differentiation of mesenchymal cells derived from human amniotic membranes into hepatocyte-like cells in vitro // Hum. Cell.—2007.—Vol. 20.—P. 77–84.
- 402. Tang X.L., Rokosh D.G., Guo Y., Bolli R. Cardiac progenitor cells and bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells for cardiac repair after myocardial infarction // Circ J.–2010.– Vol. 74, № 3.– P. 390–404.
- 403. Tani H., Morris R.J., Kaur P. Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype // Proc Natl Acad Sci USA.—2000.—Vol. 97.—P. 10960—10965.
- 404. Taupin P. Autologous transplantation in the central nervous system // Indian J Med Res. 2006, Dec. Vol. 124, № 6. P. 613–618.
- 405. Taupin P. Neural progenitor and stem cells in the adult central nervous system // Ann Acad Med Singapore.— 2006, Nov.— Vol. 35, № 11.— P. 814–820.
- 406. Teng Y.D., Liao W.L., Choi H., et al. Physical activitymediated functional recovery after spinal cord injury: potential roles of neural stem cells // Regen Med. 2006. Vol. 1(6). P. 763–776.
- 407. Terunuma A., Kapoor V., Yee C., Telford W.G., Udey M.C., Vogel J.C. Stem cell activity of human side population and α 6 integrin-bright keratinocytes defined by a quantitative in vivo assay // Stem Cells. 2007. Vol. 25. P. 664–669.

- 408. The Boulder Committee. Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology // Anat Rec.— 1970.— Vol. 166(2).—P. 257–261.
- 409. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. Embryonic stem cells derived from human blastocysts // Science.— 1998.— Vol. 282.— P. 1145–1147.
- 410. Tian D.S., Dong Q., Pan D.J., et al. Attenuation of astrogliosis by suppressing of microglial proliferation with the cell cycle inhibitor olomoucine in rat spinal cord injury model // Brain Res.—2007.—Vol. 1154.—P. 206–214.
- 411. Triel C., Vestergaard M.E., Bolund L., Jensen T.G., Jensen U.B. Side population cells in human and mouse epidermis lack stem cell characteristics // Exp Cell Res. 2004. Vol. 295. P. 79–90.
- 412. Tsai M.S., Hwang S.M., Tsai Y.L., Cheng F.C., Lee J.L., Chang Y.J. Clonal amniotic fluid-derived cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem ceils // Biol. Reprod.—2006.—Vol. 74.—P. 545—551.
- 413. Tsai M.S., Lee J.L., Chang Y.J., Hwang S.M. Isolation of human multipotent mesenchyimal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol // Hum. Reprod.–2004.– Vol. 19.– P. 1450–1456.
- 414. Tuan R.S., Boland G., Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering // Arthritis Res Ther.— 2003.— Vol. 5.— P. 32–45.
- 415. Tuch B.E. Stem cells–a clinical update // Aust Fam Physician. 2006, Sep. Vol. 35, № 9. P. 719–721.
- 416. Tumbar T., Guasch G., Greco V., Blanpain C., Lowry W.E., Rendl M., Fuchs E. Defining the epithelial stem cell niche in skin // Science. 2004. Vol. 303. P. 359–363.
- 417. Uchida N., Buck D.W., He D., et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells // Proc Natl Acad Sci USA.–2000.–Vol. 97(26).–P. 14720–14725.
- 418. Uduwela A.S., Perera M.A., Aiqing L., Fraser I.S. Endometrial-myometrial interface: relationship to adenomyosis and changes in pregnancy // Obstet Gynecol Surv.— 2000, Jun.— Vol. 55(6).—P. 390–400.
- 419. Umezawa A., Makino H. Cell source for regenerative medicine // Nippon Rinsho. –2008, May. Vol. 66(5). P. 865–872.

- 420. Van't Hof W., Mal N., Huang Y. et al. Direct delivery of syngeneic and allogeneic large-scale expanded multipotent adult progenitor cells improves cardiac function after myocardial infarct // Cytotherapy.—2007.—Vol. 9.—P. 477—487.
- 421. Vats A., Bielby R.C., Tolley N.S., Nerem R., Polak J.M. Review // Stem cells. Lancet. 2005. Vol. 366(9485). P. 592–602.
- 422. Vija L., Farge D., Gautier J.F., Vexiau P., Dumitrache C., Bourgarit A., Verrecchia F., Larghero J. Mesenchymal stem cells: Stem cell therapy perspectives for type 1 diabetes // Diabetes Metab. 2009, Apr. Vol. 35, № 2. P. 85–93.
- 423. Vrana K.E., Hipp J.D., Goss A.M., et al. Nonhuman primate parthenogenetic stem cells // Proc Natl Acad Sci USA.—2003.—Vol. 100(suppl 1).—P. 11911—11916.
- 424. Wakitani S., Saito T., Caplan A.I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine // Muscle Nerve.—1995.—Vol. 18(12).—P. 1417–1426.
- 425. Walker P.A., Shah S.K., Harting M.T., Cox C.S. Jr. Progenitor cell therapies for traumatic brain injury: barriers and opportunities in translation // Dis Model Mech. 2009, Jan-Feb. Vol. 2, № 1–2. P. 23–38.
- 426. Wang H.S., Hung S.C., Peng S.T. et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord // Stem Cells. 2004. Vol. 22. P. 1330–1337.
- 427. Weiss M.L., Medicetty S., Bledsoe A.R. et al. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease // Stem Cells.—2006.—Vol. 24.—P. 781–792.
- 428. Wells J.R., Ho W.G., Graze P., Sullivan A., Gale R.P., Cline M.J. Isolation, cryopreservation, and autotransplantation of human stem cells // Exp Hematol.—1979.—Vol. 7, suppl 5.—P. 12–20.
- 429. Wen F., Tynan J.A., Cecena G. et al. Ets2 is required for trophoblast stem cell self-renewal// Dev. Biol. 2007. Vol. 312. P. 284–299.
- 430. Wojakowski W., Kucia M., Kazmierski M., Ratajczak M.Z., Tendera M. Circulating progenitor cells in stable coronary heart disease and acute coronary syndromes: relevant reparatory mechanism? // Heart.—2008.—Vol. 94.—P. 27–33.
- 431. Wojakowski W., Kucia M., Zuba-Surma E., Ratajczak J., Machalinski B., Ratajczak M.Z., et al. Cardiogenic differentiation of

- very small embryonic-like cells isolated from adult bone marrow // J Am Coll Cardiol. 2007. Vol. 49 (Suppl A). P. 43A.
- 432. Wojakowski W., Tendera M., Kucia M. et al. Mobilization of bone marrow-derived Oct-4+ SSEA-4+ very small embryonic-like stem cells in patients with acute myocardial infarction // J Am Coll Cardiol.— 2009.— Vol. 53.— P. 1–9.
- 433. Wolbank S., Peterbauer A., Fahrner M. et al. Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane; a comparison" with human mesenchymal stem cells from adipose tissue // Tissue Eng.– 2007.– Vol. 13.– P. 1173–1183.
- 434. Wolfman N.M., Hattersley G., Cox K., Celeste A.J., Nelson R., Yamaji N., Dube J.L., DiBlasio-Smith E., Nove J., Song J.J., et al. Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF- β gene family // J Clin Invest.—1997.—Vol. 100.—P. 321–330.
- 435. Wollert K.C., Drexler H. Clinical applications of stem cells for the heart // Circ Res. 2005. Vol. 96. P. 151–163.
- 436. Wright L.S., Prowse K.R., Wallace K., Linskens M.H., Svendsen C.N. Human progenitor cells isolated from the developing cortex undergo decreased neurogenesis and eventual senescence following expansion in vitro // Exp Cell Res. 2006. Vol. 312(11). P. 2107–2120.
- 437. Wu C.C., Chao Y.C., Chen C.N. et al. Synergism of biochemical and mechanical stimuli in the differentiation of human placenta-derived multipotent cells into endothelial cells // J.Biomech.—2008.—Vol. 41.—P. 813–821.
- 438. Xiong Y., Mahmood A., Chopp M. Angiogenesis, neurogenesis and brain recovery of function following injury // Curr Opin Investig Drugs. − 2010, Mar. − Vol. 11, № 3. − P. 298–308.
- 439. Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells // Cell Stem Cell.—2007.—Vol. 1.—P. 39–49.
- 440. Ye M., Chen S., Wang X., et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor in bone marrow stromal cells of rat // Neurore-port. 2005. Vol. 16(6). P. 581–584.
- 441. Yen B.L., Chien C.C., Chen Y.C. et al. Placenta-derived multipotent cells differentiate into neuronal and glial cells in vitro // Tissue Eng. Pan A.–2008.– Vol. 14.– P. 9–17.
- 442. Yoder M.C., Mead L.E., Prater D., Krier T.R., Mroueh K.N., Li F., Krasich R., Temm C.J., Prchal J.T., Ingram D.A. Rede-

- fining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals // Blood. 2007, Mar 1. Vol. 109, № 5. P. 1801–1809.
- 443. Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells // Science.—2007.—Vol. 318(5858).—P. 1917—1920.
- 444. Yuan H., Corbi N., Basilico C., Dailey L. Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3/4 // Genes Dev.—1995, Nov 1.—Vol. 9(21).—P. 2635–2645.
- 445. Zambelli A., Poggi G., Da Prada G.A., et al. Clinical toxicity of cryopreserved circulating progenitor cells infusion // Anticancer Res.—1998.—Vol. 18.—P. 4705—4708.
- 446. Zhang H.J., Siu M.K.Y., Wong E.S.Y., Wong K.Y., Li A.S.M., Chan K.Y.K. Oct-4 is epigenetically regulated by methylation in normal placenta and gestational trophoblastic disease // Placenta.—2008.—Vol. 29.—P. 549—554.
- 447. Zhao P., Ise H., Hongo M., Ota M., Konishi I., Nikaido T.: Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes // Transplantation.— 2005.—Vol. 79.—P. 528–535.
- 448. Zhao Y., Lin B., Dingeldein M., Guo C., Hwang D., Holterman M.J. New type of human blood stem cell: a double-edged sword for the treatment of type 1 diabetes // Regen Med.— 2006, Mar.—Vol. 1, № 2.—P. 255–266.
- 449. Zhou P., Wirthlin L., McGee J., Annett G., Nolta J. Contribution of human hematopoietic stem cells to liver repair // Semin Immunopathol. 2009, Sep. Vol. 31, № 3. P. 411–419.
- 450. Zietlow R., Lane E.L., Dunnett S.B., Rosser A.E. Human stem cells for CNS repair // Cell Tissue Res.— 2008.— Vol. 331(1).— P. 301–322.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКШ – аортокоронарное шунтирование

ГСК – гемопоэтические стволовые клетки

ИБС – ишемическая болезнь сердца

КЖ – качество жизни

КМ – костный мозг

КТ – клеточные технологии

ЛПНП – липопротеиды низкой плотности

ЛПОНП – липопротеиды очень низкой плотности

MH – mental health(психологическое здоровье)

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

НК – «натуральные киллеры», лимфоидные клетки крови

ПК – пуповинная кровь

PH – physical health(физическое здоровье)

СК – стволовые клетки

ССКС – собственные стволовые клетки сердца

ФВ – фракция выброса

ФВ – фракция выброса

ФК – фетальные клетки

ФНО – фактор некроза опухоли

ХГБ – хронический гепатит Б

ХГС – хронический гепатит С

ЭСК – эмбриональные столовые клетки

CD – cluster designation (обозначение кластера)

FGF – fibroblast growth factor (фактор роста фибробластов)

HB-EGF – heparin binding epidermal growth factor (гепарин связывающий эпидермальный фактор роста)

HGF – hepatocyte growth factor (фактор роста гепатоцитов)

iPS – индуцированные плюрипотентные клетки

TGFα – transforming growth factor (преобразовывающий фактор роста альфа)

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	3
ГЛАВА І. ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	5
ГЛАВА II. КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ	12
2.1. Эмбриогенез	14
2.2. Классификация клеток	15
2.3. Эмбриональные клетки	16
2.4. Гемопоэтические СК	17
2.5. Мезенхимальные СК	18
2.6. Эндометриальные СК	28
2.7. Кластеры дифференцировки	38
2.8. Криоконсервация	41
2.9. Реконсервация	43
2.10. Фетальные клетки	44
2.10.1. Амниотическая жидкость	45
2.10.2. Вартонов студень	49
2.10.3. Амниотическая оболочка	51
2.10.4. Плацента	53
2.10.5. Пуповинная кровь	56
2.10.6. Резюме	58
ГЛАВА III. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	61
3.1. Собственные результаты	61
ГЛАВА IV. КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ	65
4.1. Клинические результаты	65
4.2. Направления клеточной терапии в кардиологии	67
4.2.1. Собственные СК сердца	68
4.2.2. Генетически обработанные прогениторные клетки	69
4.2.3. Аллогенные костномозговые клетки	70
4.2.4. Популяция VSELs клеток	71
4.2.5. Преднаправленные мезенхимальные	70
кардиопоэтические клетки	72
4.2.6. Индуцированные плюрипотентные СК	73

ГЛАВА V. КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРИ
ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ
5.1. Клеточные технологии при вирусном поражении печени
5.2. Клеточные технологии при невирусном поражении печени
ГЛАВА VI. КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И
ПОВРЕЖДЕНИЕ НЕРВНОЙ ТКАНИ
6.1. Механизмы воздействия на поврежденную нервную ткань .
ГЛАВА VII. КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И
ПОВРЕЖДЕНИЯ КОЖИ
ГЛАВА VIII. КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В
ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ МЕДИЦИНЕ
8.1. Клеточные технологии при метаболических нарушениях
8.2. Гиперлипидемия и применение клеточных технологий.
8.3. Клеточные технологии в спорте
8.4. Клеточные технологии и Качество Жизни
ГЛАВА ІХ. ЗАКОНОДАТЕЛЬНЫЕ ОСНОВЫ
РАЗВИТИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ
9.1. Законодательство в РФ
9.2. Законодательство в США
9.3. Законодательство в отношении КТ в Западной Европе
9.4. Законодательство в Великобритании
9.5. Законодательство в Европейском Союзе (ЕС)
9.6. СК и европейское патентное законодательство
9.7. Законодательство в странах Азии
9.7.1. Индия
9.7.2. Китай
ЗАКЛЮЧЕНИЕ
ЗАКЛЮЧЕНИЕ СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ
СПИСОК ЛИТЕГАТУТЫ СПИСОК СОКРАШЕНИЙ
AZITETAZZZIN NZZZINI /NITITYTTETET

Иванов Д.В., Хадарцев А.А.

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ МЕДИЦИНЕ

Монография

Под редакцией академика АМТН, д.м.н., профессора А.Н. Лищука