

*И.В. Пыко<sup>1</sup>, С.В. Корень<sup>2</sup>, З.Б. Квачева<sup>2</sup>, А.С. Федулов<sup>1</sup>*

## **Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга: свойства, функции, возможность использования в регенеративной и восстановительной терапии**

*<sup>1</sup>Белорусский государственный медицинский университет,*

*<sup>2</sup>Государственное учреждение «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» министерства здравоохранения республики Беларусь*

В настоящей работе рассматриваются особенности выделения, культивирования, иммунологии, генной экспрессии и миграционных способностей мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга. Дается характеристика их фенотипических свойств в процессе культивирования и пластичности – способности к дифференцировке (в т. ч. к трансдифференцировке в другие типы клеток, в частности в кардиомиоциты, нейроны).

Ключевые слова: костный мозг, мезенхимальные стволовые клетки, выделение, культивирование.

В течение последних десятилетий активно разрабатываются методы клеточной терапии, в частности трансплантации стволовых клеток (СК), в том числе мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, с целью замещения в организме поврежденных клеток и тканевых структур и восстановления функций различных органов. Это было вызвано расширением знаний в относительно молодом разделе клеточной биологии – биологии стволовых клеток [М.В. Угрюмов, А.Н. Коновалов, Е.И. Гусев, 2004; М.А. Пальцев, 2004].

По данным многочисленных мультицентровых рандомизированных клинических исследований существующие на сегодняшний день протоколы нейрохирургической коррекции и медикаментозной терапии нейродегенеративных заболеваний и травматических повреждений в большинстве случаев не способны обеспечить полное восстановление структуры и функции центральной нервной системы (ЦНС). Вместе с тем эти заболевания в настоящее время составляют основную группу патологии ЦНС, зачастую приводящую к серьезным медико-социальным последствиям. В связи с этим применение методов клеточной терапии как факторов, направленно стимулирующих структурно-функциональное восстановление ЦНС, приобретает особую актуальность.

Другим не менее важным направлением является использование стволовых клеток в кардиологии. Исследования интенсивно ведутся в последние 5-7 лет благодаря тому, что в 1999 г. появились работы, в которых было показано, что в условиях культуры из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, как наиболее доступного и богатого клетками источника, можно получить кардиомиоциты. Болезни системы кровообращения лидируют в статистических отчетах смертности населения. Ишемическая болезнь сердца

(ИБС) – самая распространенная форма заболеваний сердечно-сосудистой системы, является ведущей причиной смерти в экономически развитых странах. Несмотря на эффективность современных методов лечения, по-прежнему имеется необходимость в разработке принципиально новых подходов к лечению ИБС и инфаркта миокарда (ИМ) как одной из наиболее грозных форм ИБС. Одним из наиболее перспективных подходов в лечении является применение методов относительно новой отрасли медицины – регенерационной, с использованием клеточных технологий.

Поскольку все дифференцированные клетки в организме млекопитающих, участвующие в выполнении органоспецифических функций, имеют ограниченный срок жизни, замещение гибнущих клеток и поддержание структурного и клеточного гомеостаза органов осуществляются двумя основными путями: 1. за счет деления дифференцированных клеток с образованием потомков идентичного гено-и фенотипа; 2. путем замещения дифференцированных клеток потомками недифференцированных ранних предшественников – стволовых клеток (СК) при их асимметричном делении и дифференцировке в клетки соответствующего фенотипа.

Каждый из путей восстановительной регенерации клеток реализуется лишь при сохранении адекватных межклеточных взаимодействий, определяемых цитокинами, хемокинами, ростовыми факторами, белковыми молекулами межклеточного матрикса, а также при участии регионарных стволовых и прогениторных клеток и мигрирующих клеток иммунной системы [Сухих и соавт., 1999-2004 гг.].

Нарушение процессов восстановительной регенерации того или иного органа, сопровождаемое недостаточностью его функции, характеризуется растущей и не компенсируемой гибелью клеток. Этому способствуют нарушения информационного межклеточного взаимодействия, регулируемого, прежде всего клетками иммунной системы, и глубокое угнетение миграционной активности стволовых и прогениторных клеток, обеспечивающих структурное замещение погибших дифференцированных клеток.

Во взрослом организме, где процессы восстановительной регенерации органов уже не могут быть активизированы естественным путем за счет спонтанной миграции регионарных стволовых и прогениторных клеток, возникает потребность в осуществлении искусственной доставки таких клеток в поврежденный орган. Реализация такой программы связана с решением ряда проблем, среди которых важнейшей является выбор источника получения стволовых клеток.

Стволовые клетки были выделены как из эмбриональных, так и различных постнатальных тканей. Однако наличие этических проблем, связанных с использованием эмбрионального донорского материала потребовало расширенного изучения свойств постнатальных стволовых и прогениторных клеток, лишенных этого недостатка. Среди последних наиболее перспективными, с позиций применения для клеточной терапии, считаются мезенхимальные стволовые клетки (МСК) костного мозга человека.

## Свойства и функции мезенхимальных стволовых клеток костного мозга

Костный мозг – единственный орган, в котором сосуществуют и функционально взаимодействуют два различных типа стволовых клеток. Главными функциями МСК костного мозга являются: 1. Формирование гемопозиндуцирующего микроокружения (ГИМ). 2. Формирование стромального микроокружения. 3. Участие в морфогенезе. 4. Самоподдержание и восстановление пула МСК. 5. Участие в гомеостатических реакциях организма и в процессах регенерации, репарации и адаптации системы мезенхимальных клеток в норме и патологии.

Основоположником учения о МСК считается А.Я. Фриденштейн, который в начале 70-х гг. прошлого века открыл популяцию костномозговых негемопэтических клеток, которые в культуре ткани формировали так называемые колониеобразующие единицы фибробластов. Их количество в постнатальном костном мозге обычно варьирует в пределах  $(1-5) \times 10^6$ , которое с возрастом уменьшается.

К общим свойствам мезенхимальных стволовых клеток относят: способность к симметричному и асимметричному делению, высокий пролиферационный потенциал, высокая способность к адгезии, фибробластоподобная морфология, образование колоний в культуре, легко индуцируемая дифференцировка. Первоначально изучавшиеся в связи с их ведущей ролью в формировании гематопэтического микроокружения стромальные стволовые клетки костного мозга, впоследствии оказались в центре внимания с выявлением у них неожиданного дифференцировочного потенциала. Так, была установлена их идентичность стволовым клеткам костной системы, затем было показано [В.Н.Ярыгин, 2004; Е.А.Селиванов и соавт., 2004], что МСК костного мозга способны дифференцироваться в клетки костной (остеобласты), хрящевой (хондроциты), сухожильной (фибробласты), жировой (адипоциты) [5, 38], мышечной (миобласт и кардиомиоцитоподобные клетки) тканей [24] и нервной тканей [19]. На сегодняшний день установлены следующие маркеры, экспрессируемые мезенхимальными стволовыми клетками: SH-2, SH-3, SH-4, STRO-1, Sca-1, Thy-1, CD44, CD29, CD71, CD106, CD120a, CD124. Маркеры CD34, CD45 не экспрессируются, что отличает МСК от гематопэтических стволовых клеток. МСК формируют достаточно динамичную систему в костном мозге, состоящую из дифференцированных фибробластов, ретикулярных клеток, эндотелия, компонентов экстрацеллюлярного матрикса, цитокинов. При этом взаимодействие между собой и с другими клетками осуществляется через специфические рецепторы и молекулы адгезии. (Klein, 1995; Reese et al., 1999; Cheng et al., 2000).

## Пластичность и трансдифференцировка МСК *in vitro*

В течение последних лет в ряде работ указывается на обнаружение постнатальных мезенхимальных клеток-предшественников, способных к дифференцировке в клетки не мезенхимальных тканей. Изначально было показано, что костный мозг содержит миогенные клетки-предшественники, пригодные для трансплантации [13]. Затем была установлена способность

нервных стволовых клеток к восстановлению гематопоеза у облученных мышей [6]; и наоборот клетки костного мозга могут образовывать клетки нервной ткани [25] и гепатоциты [21]. Кроме того, было выявлено, что мезенхимальным стволовым клеткам присущ нейрогенный потенциал, реализуемый под действием нейроиндукторов-ретиноевой кислоты (RA), EGF, BDNF и спонтанно под воздействием соответствующего микроокружения. [19,31 O'Donoghue K., e.a., 2003]. Установлено, что МСК обладают способностью проникать через гематоэнцефалический барьер и мигрировать от места введения к различным областям мозга (Koren G.C., e.a., 1999). Было показано, что миогенез и кардиомиогенез можно вызвать при добавлении в культуру аскорбиновой кислоты, дексаметазона и 5-азациитидина. В последнее время с этой целью используют 5-азациитидин, который, как предполагается, может блокировать остеогенную и жировую дифференцировку МСК.

МСК соответствуют большинству критериев, которыми должны обладать клетки, используемые в заместительной терапии сердечно-сосудистой системы. По данным специалистов наиболее важными критериями являются: 1. способность клеток дифференцироваться в кардиомиоциты, содержать сократительные структуры; 2. присутствие между клетками вставочных дисков со щелевыми контактами для проведения потенциалов возбуждения к пересаженным клеткам от кардиомиоцитов хозяина; 3. отсутствие реакции отторжения; 4. минимальные ишемические повреждения, шок, некроз, и апоптоз пересаженных клеток; 5. способность пересаженных клеток к репарации поврежденного участка (замещение соединительной ткани и формирование полноценной биомеханической архитектоники сердечной ткани) [3].

В 1999 году S. Makino с соавт. (1999) получили кардиомиогенную клеточную линию из мышинных клеток стромы костного мозга. После обработки 5-азациитидином *in vitro* около 30% клеток дифференцировались в КМЦ, которые экспрессировали множество специфических для них генов, имели фенотип фетальных желудочковых КМЦ [24]. Похожие результаты были получены S. Tomita и др. (1999), которые вызывали повреждение миокарда с помощью жидкого азота [35]. Позже было установлено, что МСК наряду с образованием КМЦ формировали эндотелиальные клетки и гладкомышечные клетки, что улучшало функцию сердца (Шумаков и др., 2003; Davani et al., 2003). T. Wang et al. (2000) выдвинули гипотезу, что микроокружение в миокарде создает определенные условия и сигналы для кардиомиогенной дифференцировки МСК. Имеются данные и об экспериментах *in vivo*, в которых было показано, что прекультивированные МСК костного мозга после пересадки в миокард дифференцировались в кардиомиоциты, образуя щелевые контакты [37, 1]. В исследовании Шумакова и др. при трансплантации аутологичных МСК костного мозга пациентам, страдающим от сердечно-сосудистых заболеваний, спустя месяц было отмечено увеличение перфузии регионов перинфарктной зоны миокарда. Кроме этого, было отмечено восстановление региональной кинетики в этих зонах, а

также перфузии и функции свободной стенки правого желудочка. Однако, полученные результаты не были в одинаковой степени выраженными у разных больных [4].

Наряду с кроветворными и мезенхимальными СК в костном мозге присутствуют и клетки-предшественники эндотелиального ряда, которые способны при попадании в поврежденный миокард формировать новые сосуды и капилляры, улучшая оксигенацию ткани. Кроме того, МСК и вспомогательные клетки (типа эндотелия, макрофагов, лимфоцитов, стромальных механоцитов) способны секретировать многочисленные цитокины, ростовые факторы и создавать необходимое микроокружение для прогениторных клеток (Orlic et al., 2001).

Несмотря на положительные результаты применения МСК в кардиологии, нужно учитывать, что большинство экспериментальных работ выполнялись на модели инфаркта миокарда у мелких грызунов, что не позволяет достоверно оценить эффект от проводимой терапии. Кроме того, разнообразные способы, используемые для моделирования инфаркта в эксперименте не позволяют в полной мере воспроизвести ситуацию, возникающую в клинике. Также, для определения эффективности и безопасности трансплантации клеток важно проводить оценку результатов в отдаленные сроки, однако большинство исследований отражает оценку результатов в среднем до полугода [2].

Позже были описаны и менее коммитированные стволовые популяции костного мозга-МАРС [17] и МІАМІ [9], близкие по своей пластичности к эмбриональным СК.

Хотя мезенхимальные стволовые клетки были выделены из жировой ткани, скелетной мускулатуры, периферической крови, синовиальной оболочки суставов, МСК костного мозга остаются перспективным источником клеточного материала, так как было показано, что в определенных ситуациях они быстрее развиваются в культуре, образуя колонии, и легче дифференцируются, чем МСК пуповинной и периферической крови [40]. Таким образом, выбор источника для забора МСК должен осуществляться индивидуально в каждом конкретном случае с учетом комплекса определяющих факторов.

Разработка протоколов лечения стволовыми клетками костного мозга безусловно, оптимальным подходом для оценки дифференцировочного потенциала мезенхимальных стволовых клеток является их трансплантация *in vivo* при определенных экспериментальных условиях.

Костный мозг доступен для многократного получения донорских клеток, при его использовании отпадает необходимость в иммуносупрессивной терапии, поскольку возможно проведение трансплантации аутологичных клеток.

Данные о пластичности ССКМ предполагают перспективность их использования с целью репаративной регенерации клеток нервной ткани или доставки необходимых продуктов генной экспрессии в такие локусы, как центральная нервная система [33]. Это может значительно упростить подходы к клеточной терапии нервной системы, исключая необходимость

выделения и культивирования аутологичных человеческих стволовых нервных клеток, что по общему признанию является весьма сложной процедурой, хотя считается, что и гетерологичные клетки могут применяться для трансплантации, вследствие иммунопривелегированности ЦНС и специфического влияния МСК на иммунокомпетентные клетки.

Изучение возможности аллогенной трансплантации МСК

Несомненно, что золотым стандартом клеточной терапии является аутологичная трансплантация, тем не менее, представляет интерес и изучение возможностей аллогенной трансплантации МСК, в связи с их особой ролью в лимфопоэзе, в частности, в положительной селекции Т-лимфоцитов [10]. Что подразумевает подобный характер взаимодействия ССК/МСК и с клетками реципиента, что в свою очередь позволяет осуществлять аллогенную трансплантацию несовместимых по антигенам МНС ССК/МСК без сопутствующей иммуносупрессии. Так ССК/МСК не лизируются в смешанных культурах аллогенными Т-лимфоцитами и НК-клетками [22]. МСК/СКК *in vitro* значительно ингибируют пролиферацию Т-лимфоцитов в ответ на активацию поликлональными стимуляторами, специфическими антигенами или антиген-презентирующими клетками [22], что отмечается при соотношениях МСК/СКК и Т-клеток 1:10 [11], а в отдельных работах и при соотношениях 1:100 [22]. Кроме того, МСК снижают экспрессию лимфоцитами активационных маркеров CD25, CD38, CD69, уменьшают секрецию гамма-интерферона [20]. Причем отмеченные эффекты сохраняются после дифференцировки МСК [22] и обратимы при удалении МСК из культуры [20].

Причем, как установлено, иммунотолерантность к ССК/МСК со стороны иммунной системы реципиента не обусловлена отсутствием или низкой степенью экспрессии молекул МНС на поверхности МСК. Так была обнаружена высокая степень экспрессии антигенов МНС I класса и отсутствие антигенов МНС класса II, которые обнаруживались внутриклеточно [22], а после добавления в культуру гамма-интерферона МНС II класса экспрессировались и на клеточной поверхности. Однако, ССК/МСК человека не экспрессируют костимулирующие молекулы B7-1, B7-2 и CD40 [23], при отсутствии которых контакт Т-клеточного рецептора и МНС приводит к состоянию анергии Т-лимфоцитов [32].

Согласуясь с приведенными данными, в экспериментах *in vivo* при аллогенной трансплантации МСК и их дифференцировке не отмечалось каких-либо иммунологических реакций отторжения при отсутствии иммуносупрессии [12]. Вместе с тем в некоторых работах указывается на снижение иммунотолерантности к трансплантируемым МСК при их хондрогенной дифференцировке [41].

Культура мезенхимальных стволовых клеток костного мозга как метод накопления необходимой биомассы клеток для трансплантации

Костный мозг преимущественно получают путем вымывания его из бедренных костей у мышей и других мелких лабораторных животных или путем аспирации его из подвздошной кости у людей. Для накопления

необходимого количества МСК необходимо их предтрансплантационное культивирование [14]. Поскольку в костном мозге присутствует лишь небольшое количество внеклеточного матрикса, строму и гематopoэтические клетки переводят в суспензию механической диссоциацией (как правило, путем ряда пассажей через иглы с уменьшающимися диаметрами). При низкой плотности посева такой клеточной суспензии, стромальные костномозговые стволовые клетки быстро адгезируются, приобретая фибробластоподобную морфологию, хотя возможно и сохранение округлой формы при культивировании, после чего могут быть отделены от неадгезивных гематopoэтических клеток посредством повторных отмываний. В условиях культуры с использованием необходимых питательных сред, сыворотки МСК (стромальные) образуют клеточные колонии, каждая из которых происходит от одной клетки предшественника. Исследование клеточного цикла показало, что только 10% клеток в мезенхимальных колониях участвуют в процессах пролиферации. Большинство фибробластоподобных элементов находится в состоянии покоя. В свою очередь, на основании анализа ДНК и РНК, а также характера культивирования было установлено, что покоящиеся МСК представляют собой неоднородную группу. Часть из них, по-видимому встала на путь коммитирования и дифференцировки в том или ином направлении [Tamir et al., 2000].

Не существует единого протокола культивирования МСК *in vitro*, практически каждая лаборатория предлагает свои вариации состава ростовой среды, антибиотиков, субстратов. В исследовании Makino et al. [24] мышинные костномозговые клетки выращивались в среде IMDM с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки, пенициллина (100 мкг/мл), стрептомицина (250 нг/мл), амфотерицина В (85 мкг/мл). Wenrong Xu et al. [39], человеческие МСК культивировались в среде DMEM с низким содержанием глюкозы, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 5% лошадиной сыворотки, 100 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Шахов В.П. и др. [3] для культивирования мышинных МСК использовали среду DI-MEM, которая содержала 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 280 мг/л L-глутамина, 10<sup>-6</sup> М дексаметазона, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина. Концентрацию жизнеспособных клеток доводили до (0,1-10)×10<sup>6</sup>/мл. Культивирование человеческих МСК проводили в тех же условиях, заменив среду DI-MEM на DMEM. Кругляков и др. [1] для получения крысиных МСК использовали среду  $\alpha$ MEM, содержащую 20% эмбриональной телячьей сыворотки и 100 мкг/мл пенициллина или стрептомицина. В работе Матюкова [2] клетки костного мозга кролика культивировались в среде  $\alpha$ MEM с 10% процентами сыворотки эмбрионов коров и гентамицина сульфата (50 мкг/мл).

Примечательна и тенденция к внедрению бесфидерных протоколов культивирования стволовых клеток, основанных на применении аналогов компонентов экстрацеллюлярного матрикса – Matrigel [15], к замене ксеногенных фидерного слоя и сыворотки человеческими, в том числе

аутологичными [8]. В частности культивирование стромальных клеток костного мозга (СККМ) для целей клеточной терапии в аутологичной сыворотке пациента [28] Сами же МСК предлагается использовать как фидерный слой для культивирования других стволовых клеток [42].

#### Методы трансплантации МСК

Среди методов доставки клеточного материала наиболее актуальны в настоящее время эндоваскулярная трансплантация МСК с последующей спонтанной либо индуцированной миграцией клеток и стереотаксическая трансплантация непосредственно в очаг повреждения в центральной нервной системе.

Было показано, что эндоваскулярная трансплантация СК приводит к значимому функциональному восстановлению неврологического дефицита за счет клеточной миграции в головной мозг (преимущественно в зону поражения), интеграции, нейральной трансдифференцировки (GFAP+, NeuN+, MAP-2+) [18] и стимуляции эндогенного нейро-и ангиогенеза вследствие экспрессии трансплантируемыми СК нейротрофических факторов GDNF (glial cell line – derived neurotrophic factor), NGF, BDNF [7].

При сопоставлении результатов эндоваскулярного и стереотаксического методов трансплантации СК было установлено по результатам ряда функциональных тестов, что первый вариант оказался более эффективным, что обусловлено возможностью обширной диссеминации большого количества клеточного материала (оптимально от 1 до 10 миллионов клеток) [36] в ткани мозга в связи с большой площадью микроциркуляторного русла ЦНС – в среднем 60 м<sup>2</sup>; меньшей травматичностью операции в сравнении со стереотаксической трансплантацией, а вследствие этого и удобством повторного введения.

Среди способов введения МСК в поврежденную сердечную ткань можно выделить следующие: внутривенно, внутримиеокардиально, трансэндокардиально, внутрикоронарно. По данным Шахова [3] при внутривенной трансфузии МСК их количество не превышало такового в других мышечных тканях и составляло около 1-2%, тогда как внутрисердечное введение повышало этот показатель до 33-35%. Следовательно, адресное внутрисердечное введение является наиболее оптимальным методом доставки МСК в миокард.

Немаловажной для клеточной терапии является высокая миграционная способность МСК. Ранее была определена роль для мобилизации стволовых клеток таких цитокинов, как G-CSF, SCF, IL-3, Flt-3L, TPO и молекул адгезии, таких, как VLA-4 и P/E селектины. Триггером к мобилизации служат молекулярные сигналы из очага повреждения, например, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), решающую роль в синтезе которого играет тканевая гипоксия [16]. Экспрессия его поверхностного рецептора CXCR4 установлена на поверхности нейральных, гемопоэтических, мышечных и эндотелиальных клетках-предшественниках. Было установлено, что SDF-1 усиленно экспрессируют эндотелиоциты (CD-31+) с накоплением белка интра-и перивазально под влиянием hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1),



играющем центральную роль в клеточной реакции на гипоксию. При блокаде HIF-1 не наблюдалось гипоксия-зависимого синтеза SDF-1 и снижалась адгезивная способность СК в культуре.

Другим цитокином регулирующим различные биологические процессы, такие, как миграция клеток, воспаление является высокомолекулярный групповой белок 1 (High mobility group box 1) (HMGB1)-негистоновый белок, требующийся для поддержания архитектуры хроматина. Ранее показано, что HMGB1 может пассивно освобождаться гибнущими в результате травмы клетками, являясь сигналом повреждения тканей, он индуцирует стволовые клетки к трансмиграции через эндотелиальный барьер [29]. Более того, было установлено что, вслед за мобилизацией стволовые клетки способны к возврату в свои изначальные локусы.

Описанные данные, позволяют предположить, что мобилизация и хоуминг представляют собой цепь взаимосвязанных физиологических событий, представляющую интерес с точки зрения возможности целенаправленного воздействия на ее звенья с целью повышения эффективности репаративной клеточной терапии центральной нервной системы как забарьерного органа, особенно в случае не локальной, например, внутрисосудистой трансплантации МСК. При этом предполагается переход трансплантируемых МСК гематоэнцефалического барьера и их активная миграция к очагу повреждения под действием как естественных, так и введенных молекулярных сигналов.

Биобезопасность применения мезенхимальных стволовых клеток костного мозга

Некоторыми исследователями было отмечено укорочение теломер МСК при их длительном культивировании *in vitro* [30], [43] вместе с тем было обнаружено, что активность теломеразы у МСК жировой ткани выше, чем у МСК костного мозга.

Для достижения возможности длительного культивирования МСК *in vitro* предпринимались многочисленные попытки использования трансфекции «теломеразными» генными конструкциями [26], например, hTERT. Трансдуцированные МСК не меняли фенотип, кариотип и дифференцировочный потенциал в течение 2-3 лет. Однако позднее было показано, что иммортализация нормальных клеток человека теломеразными конструкциями, несёт в себе риск неопластической трансформации [27]. Таким образом, можно предположить, что протоколы по иммортализации МСК не имеют будущего с точки зрения их практического применения в клинике, что обусловлено высоким риском онкогенной трансформации, индуцированной теломеразными конструкциями.

Что касается возможности спонтанной трансформации МСК *in vitro*, то этот феномен отмечается при длительном их культивировании (более двух месяцев) в 50% образцов [34]. Таким образом, длительное культивирование МСК нецелесообразно, так как оно ассоциировано с высоким риском канцерогенеза. Все культуры МСК, предназначенные для клинического применения, необходимо кариотипировать на предмет исключения

хромосомных мутаций. Следует также учитывать отмеченные опасности при создании протоколов приготовления культур МСК *in vitro*.

В настоящее время разрабатываются генноинженерные подходы в клеточной терапии МСК чему способствует то, что МСК могут быть свободно выделены от будущего реципиента, генно модифицированы и культивированы перед аутотрансплантацией. Такой подход исключает опасность осложнений ксенотрансплантации, а также обходит ограничения и риск связанные с непосредственной доставкой пациенту генетически восстановленного материала с патоген-ассоциированными векторами.

Таким образом, на основании приведенных данных, касающихся особенностей выделения, культивирования и дифференцировочного потенциала (в т. ч. трансдифференцирования) мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, их иммунологии, генной экспрессии и миграционных способностей, можно сделать вывод об исключительной перспективности исследований терапевтического потенциала клеточной трансплантации МСК как метода коррекции неврологического дефицита, возникающего при нейродегенеративных заболеваниях, травматических и сосудистых повреждениях центральной нервной системы, а также сердечно-сосудистых заболеваниях. При этом предполагается, что функциональная компенсация будет достигаться путем структурного восстановления тканей организма в результате трансдифференцировки и интеграции трансплантированных мезенхимальных стволовых клеток и экспрессии ими факторов роста и прочих продуктов генной экспрессии. Анализ данных литературы указывает на перспективность применения внутрисосудистой трансплантации биомассы клеток, полученных из аутологичного костного мозга в клинической практике неврологии, нейрохирургии и кардиологии.

Многие специалисты уделяют внимание вопросам контроля био-и онкогенетической безопасности, используемых при разработке клинических протоколов клеточной трансплантации особенно при использовании в них генноинженерных технологий. В биологии МСК ещё очень много вопросов, ответы на которые будут найдены годами кропотливых фундаментальных исследований. Однако уже сегодня имеющиеся многообещающие экспериментальные данные результатов активных исследований указывают на возможность клинического применения мезенхимальных стволовых клеток костного мозга с целью коррекции патологии центральной нервной и сердечно-сосудистой систем.

## Литература

1. Кругляков, П.В., Соколова, И.Б., Зинькова, Н.Н., Вийде, С.К., Александров, Г.В., Петров, Н.С., Полынцев, Д.Г. Дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток в кардиомиоцитарном направлении *in vitro* и *in vivo*. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2006, № 4, с.194-197.
2. Матюков, А.А. Влияние интрамиокардиальной аутотрансплантации клеток костного мозга на перфузию ишемизированного миокарда в эксперименте. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, № 3, 2006, с. 42-48.
3. Шахов, В. П., Попов, С. В. Стволовые клетки и кардиомиогенез в норме и патологии.-Томск: STT, 2004.-170 с.
4. Шумаков, В.И., Казаков, Э.Н., Онищенко, Н.А. Первый опыт клинического применения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга для восстановления сократительной функции миокарда. Российский кардиологический журнал, № 5, 2003.
5. Bianco, P., Costantini, M., Dearden, L.C. et al. Alkaline phosphatase positive precursors of adipocytes in the human bone marrow. *Br J Haematol* 1988;68:401-403.
6. Bjornson, C.R., Rietze, R.L., Reynolds, B.A. et al. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*. *Science* 1999; 283:534-537.
7. Borlongan, C.V. et al. Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. *Stroke*. 2004; 35: 2385
8. Cheng, L. et al. Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture. *Stem Cells* 2003; 21: 131-42.
9. D'Ippolito, G. et al. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci* 2004; 117: 2971-2981
10. Dejbakhsh-Jones, S. et al. Extrathymic maturation of alpha beta T cells from hemopoietic stem cells. *J Immunol* 1995; 155: 3338-3344
11. Di Nicola, M. et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99: 3838-3843
12. Djouad, F. et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 2003; 102: 3837-3844
13. Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M. et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279:1528-1530.
14. Friedenstein, A.J., Shapiro-Piatetzky, I.I., Petrakova, K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966;16:381-390.
15. Geron Corporation Registered Cell Lines (United States). Geron Corporation. Protocols for the maintenance of human embryonic stem cells in feeder free conditions.

16. Hitchon, C. et al. Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 2587-2597;
17. Jiang, Y. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. 2002; 418: 41-49
18. Jieli, Chen et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke* 2001; 32: 2682.
19. Kopen, G.C., Prockop, D.J., Phinney, D.G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:10711-10716.
20. Krampera, M. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003; 101: 3722-3729
21. Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M. et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6:1229-1234.
22. Le Blanc, K. et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2003; 31: 890-896
23. Majumdar, M. et al. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci* 2003; 10: 228-241
24. Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S. et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999;103:697-705.
25. Mezey, E., Chandross, K.J., Harta, G. et al. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000; 290:1779-1782.
26. Mihara, K. et al. Development and functional characterization of human bone marrow mesenchymal cells immortalized by enforced expression of telomerase. *Br J Haematol* 2003; 120; 5: 846-849
27. Milyavsky, M. et al. Prolonged culture of telomerase-immortalized human fibroblasts leads to a premalignant phenotype. *Cancer Res* 2003; 63: 7147 – 7157
28. Mobest, D. et al. Serum-free ex vivo expansion of CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Biotechnol Bioeng* 1998; 60; 3: 341-7.
29. Palumbo, R., Bianchi, M.E. High mobility group box 1 protein, a cue for stem cell recruitment. *Biochem Pharmacol.* 2004; 15;68(6):1165-70.
30. Parsch, D. et al. Telomere length and telomerase activity during expansion and differentiation of human mesenchymal stem cells and chondrocytes. *J Mol Med* 2004; 82; 1: 49-55
31. Sanchez-Ramos, J. et al. Expression of neural markers in human umbilical cord blood *Exp Neurol* 2001; 171: 109-115
32. Schwartz, R.H. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990; 248: 1349-1356
33. Schwarz, E.J., Alexander, G.M., Prockop, D.J. et al. Multipotential marrow stromal cells transduced to produce L-DOPA: engraftment in a rat model of Parkinson disease. *Hum Gene Ther* 1999;10:2539-2549.

34. Spontaneous Human Adult Stem Cell Transformation. Daniel Rubio, Javier Garcia-Castro, Maria C. Martin, Ricardo de la Fuente, Juan C. Cigudosa, Alison C. Lloyd and Antonio Bernad. *Cancer Res* 2005; 65: 3035-3039
35. Tomita, S., Li, R.K., Weisel, R.D. et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation*. 1999;100(suppl II):II-247-II256.
36. Vendrame, M. et al. Infusion of human umbilical cord blood cells in a rat model of stroke dose-dependently rescues behavioral deficits and reduces infarct volume. *Stroke* 2004; 35: 2390;
37. Wang, J.-S., Shum-Tim, D., Galipeau, J. et al. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *Thorac Cardiovasc Surg* 2000;120:999-1006
38. Weiss, L. Haemopoiesis in mammalian bone marrow. *Ciba Found Symp* 1981;84:5-21.
39. Wenrong Xu, Xiran Zhang, Hui Qian, Wei Zhu, Xiaochun Sun, Jiabo Hu, Hong Zhou and Yongchang Chen. Mesenchymal Stem Cells from Adult Human Bone Marrow Differentiate into a Cardiomyocyte Phenotype In Vitro. *Experimental Biology and Medicine* 229:623-631 (2004).
40. Wexler, S.A. et al. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal “stem” cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 2003; 121; 2: 368-374
41. Xi Chen, Angela McClurg, Guang-Qian Zhou, Mervyn McCaigue, Marilyn Ann Armstrong, Gang Li. Chondrogenic Differentiation Alters the Immunosuppressive Property of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells, and the Effect Is Partially due to the Upregulated Expression of B7 Molecules *Stem Cells* Feb 1 2007: 364 – 370.
42. Yamaguchi, M. et al. Bone marrow stromal cells prepared using AB serum and bFGF for hematopoietic stem cells expansion. *Transfusion* 2002; 42: 921-927.
43. Zimmermann, S. et al. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia*. 2003; 17; 6: 1146-1149.