

## ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИИ И РЕГЕНЕРАЦИИ ОРГАНОВ

*Еремеева М.В.*

Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН, Москва

Стимуляция ангиогенеза в ишемизированных тканях путем воздействия различными ангиогенными факторами долгое время остается в центре внимания ученых. Ключевую роль в процессе неоангиогенеза при ишемии играют эндотелиальные клетки-предшественники, богатейшим резервуаром которых является костный мозг. Однако в некоторых тканях или в снабжающих орган кровеносных сосудах содержатся резидентные эндотелиальные клетки-предшественники, которые также участвуют в неоангиогенезе. Теоретически экзогенное введение клеток-предшественников эндотелиоцитов может способствовать восстановлению кровоснабжения органа. В ряде экспериментальных протоколов в целях стимуляции регенерации миокарда были апробированы различные типы клеток. В результате исследований был получен универсальный результат в виде улучшения сократительной функции сердца в различной степени, но механизмы этого эффекта трансплантации различных типов клеток остаются малоизученными. В статье рассматриваются преимущества и недостатки применения эмбриональных, гематopoэтических и мезенхимальных стволовых клеток с целью стимуляции ангиогенеза и регенерации органов и тканей.

*Ключевые слова:* неоангиогенез, регенерация миокарда, эмбриональные стволовые клетки, гематopoэтические стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки

## APPLICATION OF STEM CELLS AND PRECURSOR CELLS FOR STIMULATION OF ORGAN REVASCULARIZATION AND REGENERATION

*Eremeeva M.V.*

A.N. Bakulev Scientific Center of Cardiovascular Surgery, RAMS, Moscow

Different angiogenic factors induced angiogenesis stimulation in ischemic tissues stays in the focus of scientific research for long time. The key role in ischemic angiogenesis belongs to endothelial precursor cells, plenty of which are reserved in bone marrow. Resident endothelial precursor cells are also found in some tissues and in circulation. These cells are involved in neoangiogenesis as well. Theoretically, injection of exogeneous endothelial precursor cells might contribute to restoration of circulation in the ischemic organ. Various types of cells have been approved for regeneration stimulation in a number of experimental protocols. A various degree of improvement of myocardial contractive function has been obtained as a universal result of these investigations, though the mechanisms underlying observed effect remain evasive. The paper focuses on advantages and drawbacks of embryonic, hematopoetic and mesenchymal stem cells application for angiogenesis stimulation and organs and tissues regeneration.

*Key words:* neoangiogenesis, myocardial regeneration, embryonic stem cells, hematopoetic stem cells, mesenchymal stem cell

Быстрая ревазуляризация поврежденных, ишемизированных и регенерирующих органов необходима для восстановления функции органа. Ангио-

генный сигнал запускает процесс ревазуляризации, базирующийся на привлечении эндотелиальных клеток, формирующих новые сосуды. Долгое вре-

*Статья поступила в редакцию 29.06.09 г.*

**Контакты:** Еремеева Марина Викторовна, к. б. н., руководитель лаборатории клеточных технологий НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. Тел. (495) 414-79-50, моб. 89161838269, e-mail: m\_horoviz@hotmail.com

мя основные усилия исследователей и клиницистов были направлены на попытки ускорения ревазуляризации тканей посредством стимуляции разнообразными ангиогенными факторами [22, 25]. Однако, поскольку повреждение тканей сопровождается разрушением соответствующего микроокружения, необходимого для привлечения пре-сформированных эндотелиальных клеток (ЭК), экзогенное введение клеток-предшественников тканей сосудов теоретически может способствовать восстановлению кровоснабжения органа. Накапливаются данные, указывающие, что в костном мозге имеются такие клетки-предшественники и что они могут быть привлечены в ишемизированные участки, способствуя процессу неоангиогенеза, осуществляемому пре-сформированным эндотелием, ускоряя тем самым ревазуляризацию органа.

Костный мозг взрослого человека – богатейший резервуар ткане-специфических стволовых клеток и клеток-предшественников. Небольшую популяцию среди них составляют ЭК-предшественники (ЭКП). При необходимости ЭКП поступают в циркуляцию и принимают участие в процессах неоангиогенеза. Циркулирующие ЭКП (ЦЭП) обнаруживаются в циркуляции либо после повреждения сосудов, либо в период роста опухоли. Преимущественно ЦЭП образуются из ЭКП в костном мозге и отличаются от слущенных зрелых ЦЭК, изредка попадающих в циркуляцию в результате тупой травмы сосудов. Возможно, однако, что в паренхиме сосудистой системы некоторых органов содержатся эндогенные ЭКП-подобные клетки. Например, небольшая популяция стволовых клеток в скелетной мускулатуре способна дифференцироваться в ЭК [33]. Таким образом, источником ЦЭП могут служить либо ЭКП костномозгового происхождения, либо резидентные ЭКП, локализованные в тканях органа или снабжающих орган кровеносных сосудов.

Наряду с ЭКП и ЦЭК некоторые ангиогенные факторы потенцируют мобилизацию стволовых гематопоэтических клеток (ГСК) и клеток-предшественников гематопоза (ГКП). Совместное действие клеток всех этих типов способствует инициации и развитию процесса неоангиогенеза. Физиологическую роль корекрутируемых ГСК и ГКП в формировании длительно функционирующих новых сосудов еще предстоит определить.

В ряде исследований было показано, что клетки костномозгового происхождения функционально участвуют в процессах неоангиогенеза при заживлении ран и ишемии нижних конечностей [4], в процессе реабилитации после инфаркта миокарда, в процессе эндотелиализации трансплантатов сосудов [24], при атеросклерозе [46], в процессе неоваскуляризации сетчатой оболочки глаза и лимфоидных органов [40], в процессе васкуляризации,

сопутствующем неонатальному росту [58], и в росте опухолей [45].

В результате остро развившейся ишемии происходит резкое уменьшение количества клеток в органе. Процесс этот характерен не только для сердца, но и для других органов, вне зависимости от пролиферативной характеристики входящих в их состав паренхиматозных клеток (быстро пролиферирующие, медленно пролиферирующие или терминально дифференцированные), и завершается формированием рубцовой ткани [29].

Ряд экспериментальных подходов был использован для стимуляции регенерации миокарда. В этих экспериментальных протоколах использовали различные типы клеток, включая фетальные ткани, фетальные и взрослые кардиомиоциты [60], скелетные миобласты [35], миоциты и эндотелиальные клетки эмбрионального происхождения [9], костномозговые незрелые миоциты [19], фибробласты [15], гладкомышечные клетки [31], костномозговые *c-kit*-положительные и отрицательные клетки-предшественники [23, 57].

Несколько неожиданно все эти разнообразные подходы дали довольно универсальный положительный эффект, заключавшийся в различной степени улучшения сократительной функции миокарда. Наиболее вероятным механизмом представляется формирование за счет введенных клеток пассивного трансплантата, снижающего ригидность рубцовой части стенки желудочка. Вероятно, эластические свойства имплантированных клеток лежат в основе улучшения функции сердца. Лишь в небольшом числе исследований удалось продемонстрировать формирование активного трансплантата, участвующего в динамической работе сердца [13, 23]. Было выдвинуто также предположение о том, что введенные клетки могут оказывать паракриновое воздействие на резидентные стволовые клетки миокарда (CSC), активируя тем самым восстановление миокарда [57].

Несмотря на достигнутые успехи, наиболее адекватный вариант клеточной терапии, ведущий к истинной *restitutio ad integrum* поврежденного миокарда, еще предстоит идентифицировать.

### **Эмбриональные стволовые клетки человека**

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) берут начало от внутренней массы бластоцисты [38] и обладают уникальными свойствами. Эти клетки удается неопределенно долго размножить в культуре *in vitro* без изменения их недифференцированного фенотипа и при сохранении нормального кариотипа. Кроме того, они сохраняют свойство тотипотентности, т. е. способны дифференцироваться *in vitro* в любой тип клеток, имеющих в организ-

ме [7]. В надежде на их исключительный потенциал из бластоцисты человека был получен ряд линий ЭСК с целью лечения широкого спектра патологий [11, 42]. Существуют, тем не менее, некоторые сомнения по поводу сравнительной терапевтической ценности ЭСК и аутологичных взрослых клеток-предшественников (КП), что не может не огорчать, поскольку применение ЭСК в клинической практике ожидается не ранее чем через 10 лет, а КП на сегодня являются единственным безопасным терапевтическим агентом клеточной регенерации миокарда. Не исключено однако, что в будущем ЭСК станут мощной альтернативой взрослым КП.

Введение линий человеческих ЭСК в скелетную мышцу или семенник ведет к образованию тератомы. Тератома состоит из эндодермы, мезодермы и эктодермы, сформированных зрелыми клетками. Напротив, тератокарциномы содержат недифференцированные и стволовые клетки [7]. Несмотря на то что способность ЭСК к злокачественному перерождению окончательно не доказана, настораживает наличие ряда общих маркеров, включая Oct4 и Nanog, у ЭСК и клеток эмбриональной карциномы [7, 18]. Более того, регуляция процессов самообновления популяций ЭСК и клеток эмбриональной карциномы осуществляется сходным образом [7]. Связанные с широким дифференцировочным потенциалом ЭСК *in vivo* риски существенно лимитируют возможности их применения в исходном некоммитированном состоянии для лечения сердечной патологии [21, 26].

В этих исследованиях, в прямом противоречии с плюрипотентностью ЭСК, было отмечено появления кардиомиоцитов, но не капиллярных структур или артериол. То есть не происходило формирования функционально полноценного миокарда. В то же время *in vitro* ЭСК человека дифференцируются в клетки эндотелия и формируют микрососуды в подкожной клетчатке мышей с комбинированным иммунодефицитом (SCID) [30]. Дифференцировку ЭСК в кардиомиоциты относят на счет паракриновых сигналов реципиента, опосредованных белками суперсемейства TGF- $\beta$  [26].

Несмотря на регистрацию некоторого функционального улучшения, терапевтическое применение ЭСК сопряжено с риском развития существенных побочных эффектов. Тератомы относят к доброкачественным новообразованиям, однако локализация в сердце дает эффект биологической злокачественности. Особенно важно, что при внутривенном введении ЭСК они попадают и заселяют все органы, создавая риск неоплазии [54].

Предварительная дифференцировка ЭСК *in vitro* перед введением в поврежденный миокард теоретически способна уменьшить риск развития неоплазии [59]. Предполагается, что определенная степень

комитированности в направлении кардиомиоцитов способствует встраиванию трансплантируемых клеток в миокард и снижает вероятность дифференцировки ЭСК в нежелательном направлении, уменьшая тем самым риск формирования тератомы [53]. Несмотря на то, что морфология, фенотип и функциональные свойства полученных из ЭСК незрелых миоцитов были охарактеризованы, остаточный потенциал роста этих клеток пока не установлен. Кроме того, серьезной проблемой остается чистота выделяемых клеток, поскольку всегда есть риск присутствия плюрипотентных ЭСК среди развивающихся миоцитов, и инъекция такой суспензии может привести к образованию опухоли. До сих пор не отработан четкий метод дифференцировки ЭСК в кардиомиоциты *in vitro* [20]. Символично, что с помощью восьми факторов роста удалось лишь частично индуцировать специфический фенотип клеток. При этом в препарате постоянно присутствовала примесь нежелательных клеток [48]. Ни один из ростовых факторов не был способен стимулировать дифференцировку клеток единого типа. Именно поэтому в современных условиях не удастся в культуре получить из ЭСК гомогенную популяцию дифференцированных клеток.

Дополнительное ограничение применения ЭСК создает проблема иммунного отторжения аллогенных ЭСК или их дифференцированного потомства [12]. На ранних стадиях развития ЭСК принято считать «иммунопривилегированными», т. е. не распознаваемыми иммунной системой реципиента. Существуют, тем не менее, недавно полученные данные об экспрессии антигенов HLA первого класса на поверхности даже недифференцированных ЭСК, причем по мере созревания клеток уровень экспрессии возрастает [34]. Иммуносупрессивная терапия обыкновенно плохо переносится, и во всяком случае, существенно снижает качество жизни больного. В то же время не исключено, что интенсивные исследования в данной области помогут решить текущие биологические проблемы и изменят скептицизм в отношении перспектив терапевтического применения ЭСК.

Наконец, перспектива применения человеческих ЭСК порождает серьезные этические проблемы. Активные исследования человеческих ЭСК чрезвычайно привлекательны и перспективны, однако необходимость помогать страждущим не должна превалировать над моральным императивом отношения к человеку как к субъекту, а не как к объекту. Относительно недавно был предложен любопытный взгляд на проблему [28]. По аналогии с тем, как смерть взрослого человека регистрируется в соответствии с критериями смерти мозга, предлагается регистрировать смерть эмбриона по признаку утраты основной функции, каковой предлагается счи-

тат интегрированный показатель деления, роста и дифференцировки клеток эмбриона. Тем самым смерть эмбрионального организма заключается скорее в необратимом прекращении деления клеток, а не в смерти всех и каждой его клетки [28]. Около 60% оплодотворенных *in vitro* яйцеклеток прекращают деление через 24 часа. Часто это подавление роста связано с существенными генетическими нарушениями, однако аномальными являются необязательно все клетки эмбриона. В таких мозаичных эмбрионах удается обнаружить по меньшей мере один нормальный диплоидный бластомер [28]. Таким образом, этические нормы, действующие при пересадке органов, возможно распространить на сбор человеческих ЭСК из мертвых эмбрионов, создавая тем самым правовую базу, в рамках которой необходимость защиты человеческого достоинства более не вступает в конфликт с прогрессом в области биомедицинских исследований.

### Гематопозитические стволовые клетки

Костный мозг взрослого человека состоит из нескольких клеточных популяций. Помимо дифференцированных клеток, таких как адипоциты, остеобласты и остеокласты, а также клеток, образующих строму и сосуды, имеется популяция примитивных клеток. Эта популяция, в свою очередь, гетерогенна и состоит из недифференцированных гематопозитических стволовых клеток (ГСК) и мезенхимальных стволовых клеток (МСК) [43, 49]. Обе эти субпопуляции использовали для восстановления поврежденных органов [16, 27], однако чаще встречается применение неразделенной массы клеток костного мозга [6, 41]. В дальнейшем изложении мы будем называть эту гетерогенную клеточную популяцию костномозговыми клетками (КМК), имея в виду, что данный препарат состоит преимущественно из ГСК с той или иной примесью МСК и ЭСК.

Хотя ГСК были идентифицированы более четырех десятилетий тому назад, их выделение стало возможно значительно позднее, в связи с выявлением их поверхностных маркеров [55]. Маркеры ГСК различаются у разных видов. Фенотип мышинных ГСК: *c-kit+Sca-1+Thy-1-low* [39]. Однако функционально эти клетки гетерогенны. Было показано, что внутри данной популяции Мас-1 негативные, CD4-негативные клетки содержат длительно живущие, репопулирующие опустошенный облучением костный мозг клетки [36]. Напротив, слабо экспрессирующие Мас-1, CD4-негативный пул содержат короткоживущие репопулирующие клетки. Наконец, слабо экспрессирующие и Мас-1, и CD4-клетки содержат транзиторные мультипотентные предшественники, а также предшественники В-лимфоцитов [36]. Для выделения человеческих ГСК используют маркер CD34, хотя ГСК обнару-

живаются также в CD34-негативной фракции [17]. Еще один маркер человеческих ГСК – AC133 [5], хотя на сегодня специфический эпителий истинных стволовых клеток окончательно не определен.

Несмотря на то что имеются определенные сомнения в терапевтической эффективности КМК при сердечной патологии [10], в целом ряде исследований было показано, что введение КМК улучшает функционирование больного сердца [13, 23, 57], однако механизм этого улучшения остается непонятным. Неясность в данном вопросе не повлияла на проведение клинических испытаний метода. Некоторые из этих испытаний уже завершены, а часть продолжается. Продемонстрирована безопасность данного подхода, и проводятся клинические испытания двойным слепым методом. Ограниченные возможности анализа регенерации миокарда у человека, связанные с трудностью получения биопсии миокарда, а также противоречивые результаты экспериментов на животных допускают разнообразные объяснения положительных результатов введения КМК. Обсуждаются три основные возможности, а именно развитие коронарных сосудов, восстанавливающих питание гибернированного миокарда, формирование *de novo* миоцитов и сосудов или активация роста резидентных клеток-предшественников через паракриновый эффект имплантированных КМК [13, 23, 57, 60]. Эти механизмы действия КМК не являются взаимоисключающими, и могут способствовать восстановлению больного сердца. Однако необходим серьезный анализ имеющихся на сегодня данных, с тем чтобы определить, что еще необходимо сделать для окончательного определения истинного места КМК в лечении сердечных заболеваний. Такой анализ может быть проведен посредством сравнения использованных клинических протоколов и результатов, полученных в экспериментах на животных.

Ограниченность терапевтического потенциала КМК давно не новость. Если бы циркулирующие КМК обладали способностью спонтанно заселять и восстанавливать поврежденные органы, зоны инфаркта в сердце, мозге, коже, почках и кишечнике быстро регенерировали бы, и большинства современных заболеваний человека просто бы не существовало. Поэтому исследования, основанные на использовании циркулирующих КМК, не способны ответить на существующие сегодня вопросы и только запутывают существо дела. Принципиальный вопрос, требующий серьезного изучения, заключается в следующем: способны ли КМК, введенные непосредственно в зону инфаркта или пограничную зону, дифференцироваться в клетки миокарда и способствовать его регенерации?

Для проведения такого рода исследований в настоящее время в качестве золотого стандарта пред-

ложены естественные генетические маркеры. В качестве маркера регенерирующих кардиомиоцитов широко применяются Y-хромосома и флюоресцентный белок EGFP [23]. Несколько лет назад *c-kit*-позитивные КМК были выделены от самцов трансгенных мышей, несущих меченый *c-myc* ядерный Акт под контролем миокард-специфического промотора тяжелой цепи  $\alpha$ -миозина [49]. Эти клетки вводили самкам мышей линии, использованной для получения трансгенных животных, в зону острого инфаркта сразу после индукции и через несколько дней после этого изучали процессы регенерации. В участке вновь сформированного миокарда были обнаружены мелкие миоциты, экспрессирующие  $\alpha$ -актин саркомеров, тропонин I,  $\alpha$ -актинин, коннексин 43 и N-кадгерин. Во всех случаях ядра этих развивающихся миоцитов положительно окрашивались на *c-myc*.

Сосудистые структуры и CD45-положительные клетки в восстановленной ткани были *c-myc*-отрицательными. Y-хромосома находилась в эндотелиальных и гладкомышечных клетках, но не в CD45-положительных клетках. Таким образом, введенные в погибший миокард КМК не дифференцируются по гематопоезическому пути, но приобретают фенотип кардиомиоцитов и восстанавливают поврежденное сердце.

В более поздних исследованиях в качестве механизма благоприятного воздействия клеточной терапии на ишемизированный миокард наряду с регенерацией мертвой ткани изучалась активация резидентных клеток-предшественников в поврежденной стенке желудочка [23, 57]. Для точной сравнительной оценки формирования кардиомиоцитов и коронарных сосудов в пограничной с инфарктом зоне и в отдаленных участках сердца использовали морфометрические методы наряду с применением маркеров клеточного цикла. Несмотря на использование одинаковых протоколов для регистрации роста миоцитов и сосудов, противоречивые результаты были получены в отношении паракринового эффекта введенных КМК [23, 57]. При этом в одном случае использовали обогащенную популяцию мышинных *c-kit*-положительных КМК, а в другом – новую популяцию КМК человека [57]. Обе клеточные популяции обладали способностью к дифференцировке в клетки сердца, однако человеческие КМК наряду с этим стимулировали выраженную регенеративную реакцию в живых клетках зоны инфаркта. Таким образом, специфические КМК человека способны трансдифференцироваться в кардиомиоциты, гладкомышечные клетки, а также клетки эндотелия в условиях *in vitro* и *in vivo* [13, 57]. Дополнительно уникальная клеточная популяция может индуцировать эндогенную неоваскуляризацию и кардиомиогенез [57]. Эти результаты поддержива-

ют предположение о способности КМК приобретать сердечный фенотип и потенцировать ростовые резервы взрослого сердца. Суммарно проведенные исследования указывают на серьезный терапевтический потенциал КМК в отношении сердечной патологии человека [3, 47].

### Мезенхимальные стволовые клетки

Термин «мезенхимальные стволовые клетки» (МСК) был введен в практику в 1961 году А.Я. Фриденштейном, продемонстрировавшим наличие остеогенных предшественников среди клеток стромы костного мозга. В дальнейшем были отработаны условия размножения и дифференцировки этих клеток, и было показано, что они быстро пролиферируют и образуют колонии различного размера и клеточной плотности, состоящие из нескольких линий мезенхимальных клеток [14]. МСК экспрессируют SH2, SH3, CD29, CD44, CD71, CD90, CD106, CD120a и CD124 [43] и негативны по маркерам гематопоезического ростка, включая CD34 и общий лейкоцитарный маркер CD45 [43]. Однако Prockop и ряд других исследователей [51] придерживаются мнения, что МСК невозможно идентифицировать исключительно по экспрессии антигенов, но необходимо функциональное подтверждение их мультипотентности. Таким образом, окончательный консенсус о свойствах МСК пока не достигнут.

Несмотря на то что МСК обладают способностью к самообновлению и дифференцировке в различные типы клеток, их участие в физиологическом процессе обновления клеток органов, в которых они локализуются, остается под вопросом. Тем не менее МСК считают перспективной клеткой для реконструкции органов и целевой доставки генов [27]. Их легко трансфецировать генетическими конструкциями, и они живут в организме длительное время после трансплантации [52], сохраняя при этом способность к дифференцировке по нескольким направлениям. Хорошим примером безопасности и эффективности клинического применения МСК является их использование для восстановления хрящевой и костной тканей. Клинические испытания, базирующиеся на терапевтическом потенциале МСК, проводились и проводятся по всему миру; МСК внутривенно вводили детям с генетическими нарушениями остеогенеза, *osteogenesis imperfecta*. Так впервые было показано, что МСК костномозгового происхождения способны заселять другие органы, оказывая при этом благоприятное воздействие. Недавно была предпринята попытка введения аутологичных МСК онкологическим больным в надежде стимулировать восстановление гематопоеза в ходе химиотерапии. В исследованиях на животных разных видов было показано, что костномозговые МСК проявляют хоуминг в отношении сердца и способ-

твуют регенерации миокарда после инфаркта [50]. При этом регенерация в результате введения МСК, возможно, опосредована паракриновым действием. Трудно предсказать, найдут ли МСК применение в качестве средства лечения ишемической болезни сердца человека, но на сегодня это представляется вполне вероятным.

### Клинические испытания

Наряду с изучением механизмов влияния генных препаратов и стволовых клеток на функционирование сердечной мышцы и регенерацию сосудов проведены и проводятся в настоящее время целый ряд клинических испытаний разнообразных вариантов терапии, основанной на применении вышеуказанных методов. Так, Mariann Gyöngyösi и соавт. (2009) провели рандомизированное исследование результатов комбинированного (локально и внутривенно) введения костномозговых мононуклеарных клеток костномозгового происхождения на ранних (3–6 недель) и поздних (3–4 месяца) стадиях инфаркта миокарда (MYSTAR). Им удалось показать, что в обеих группах происходит умеренное, но статистически значимое уменьшение размеров инфаркта и улучшение функции левого желудочка.

М. Chochola и соавторы [8] продемонстрировали перспективность внутриартериального введения костномозговых мононуклеаров для лечения больных критической (предампуационной) ишемией нижних конечностей.

Опираясь на положительные результаты, полученные при применении алогенных эмбриональных стволовых клеток для лечения врожденной кардиомиопатии [56], на экспериментальной модели исследовали механизмы, лежащие в основе достигнутого эффекта. Им удалось продемонстрировать дифференцировку пересаженных клеток в мышечную сердечную ткань, сопровождаемую уменьшением зон фиброза и улучшением сократительной функции.

Группа экспертов медицинского страхового общества «Ассоциация Синего Креста и Синего Щита» провела ретроспективный анализ результатов клинических испытаний применения аутологичных клеток-предшественников для лечения ишемической болезни сердца (<http://www.bcbs.com/blueresources/tec/vols/23/autologous-progenitor-cell.html>). Для анализа были отобраны суммирующие результаты клинических испытаний 15 публикаций в реферируемых англоязычных журналах за период с января 1995-го по август 2008 г. Кроме того, количество проанализированных больных в каждом исследовании составляло не менее 25 для острой ишемической болезни сердца и не менее 10 для хронической ИБС. В наиболее крупных из проанализированных испытаний – REPAIR-AMI [47] и

ASTAMI [32] были получены наиболее значимые результаты. В большинстве испытаний в качестве основного критерия эффективности клеточной терапии использовали функцию выброса левого желудочка (ФВЛЖ). Количественный мета-анализ этого показателя по 10 испытаниям, в которых исследовались больные острой ИБС, показал среднее увеличение ФВЛЖ на 3% ( $p < 0,00001$ ). В то же время авторы отмечают недостаточность имеющихся в литературе данных для вынесения окончательного заключения о целесообразности применения клеточной терапии для лечения ИБС, поскольку за исключением ФВЛЖК, результаты сравнительной оценки других клинических параметров в контрольной и опытной группах не столь однозначны.

В связи с этим представляет интерес возможность применения клеточной терапии ИБС в комбинации с факторами, стимулирующими накопление стволовых клеток в ишемизированной ткани. В клинике часто пересадку клеток костного мозга предваряют введением G-CSF – фактора, стимулирующего мобилизацию гематопозитических клеток-предшественников в участке ишемии сердечной мышцы (nature clinical practice CARDIOVASCULAR MEDICINE september 2008 vol. 5 no 9, p. 590–591). Дополнительные возможности в этом направлении были продемонстрированы С. Napoli и соавт. [37], в экспериментальной модели ишемии задней конечности на мышцах показавшими, что комбинированное введение двух факторов – G-CSF и паратироидного гормона (ПТГ) – улучшает результаты последующей клеточной терапии [37]. По их данным, введение G-CSF/ПТГ приводит к увеличению интенсивности кровотока, плотности капиллярной сети и количества циркулирующих клеток в зоне ишемии. Параллельно с этим происходит уменьшение концентрации воспалительных и апоптотических клеток. Обнадешивающие данные получены в результате проведения первой фазы клинических испытаний, где было показано, что больные не-ходжкинской лимфомой или лимфомой Ходжкина хорошо переносят введение ПТГ в течение 14 дней [1].

Совершенно новое направление исследований связано с возможностью создания пациент-специфических плюрипотентных клеток-предшественников посредством генетической модификации [44]. Воодушевление научного сообщества вызывает принципиальная возможность лечить такие состояния, которые прежде признавались неизлечимыми. Однако на этом светлом пути еще предстоит преодолеть многочисленные препятствия, связанные с отбором генов-кандидатов, способов введения, разработкой безопасных для пациента средств генетической трансформации и т. п. [2].

Для клинического применения трансплантации клеток-предшественников определяющими кри-

териями должны быть *безопасность и эффективность* этого метода лечения в каждом конкретном случае.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adams G.B. et al. Therapeutic targeting of a stem cell niche // *Nat Biotechnol.* 2007. Vol. 25. P. 238–243.
2. Ahrlund-Richter L., De Luca M., Marshak D. et al. Isolation and Production of Cells Suitable for Human Therapy: Challenges Ahead // *Cell Stem Cell.* 2009. Vol. 4. P. 20–26.
3. Angoulvant D., Fazel S., Li R.K. Neovascularization derived from cell transplantation in ischemic myocardium // *Mol Cell Biochem.* 2004. Vol. 264. P. 133–142.
4. Asahara T. et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization // *Circ. Res.* 1999. Vol. 85. P. 221–228.
5. Bhatia M. AC133 expression in human stem cells // *Leukemia.* 2001. Vol. 15. P. 1685–1688.
6. Brittan M., Braun K.M., Reynolds L.E. et al. Bone marrow cells engraft within the epidermis and proliferate *in vivo* with no evidence of cell fusion // *J. Pathol.* 2005. Vol. 205. P. 1–13.
7. Chambers I., Smith A. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells // *Oncogene.* 2004. Vol. 23. P. 7150–7160.
8. Chochola M., Pytlík R., Kobyłka P. et al. Autologous intra-arterial infusion of bone marrow mononuclear cells in patients with critical leg ischemia // *Int. Angiol.* 2008. Vol. 27 (4). P. 281–290.
9. Condorelli G., Borello U., De Angelis L. et al. Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: implication for myocardium regeneration // *Proc. Nat. Acad. Sci USA.* 2001. Vol. 98. P. 10733–10738.
10. Davani S., Deschaseaux F., Chalmers D. et al. Can stem cells mend a broken heart? // *Cardiovasc Res.* 2005. Vol. 65. P. 305–316.
11. Doss M.X., Koehler C.I., Gissel C. et al. Embryonic stem cells: a promising tool for cell replacement therapy // *J. Cell Mol. Med.* 2004. Vol. 8. P. 465–473.
12. Drukker M., Benvenisty N. The immunogenicity of human embryonic stem-derived cells // *Trends Biotechnol.* 2004. Vol. 22. P. 136–141.
13. Fernandez-Aviles F., San Roman J.A., Garcia-Frade J. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction // *Circ Res.* 2004. Vol. 95. P. 742–748.
14. 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.
15. Galli D., Innocenzi A., Staszewsky L. Mesoangioblasts, vessel-associated multipotent stem cells, repair the infarcted heart by multiple cellular mechanisms. A comparison with bone marrow progenitors, fibroblasts and endothelial cells // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005. Vol. 25. P. 692–697.
16. Grove J.E., Bruscia E., Krause D.S. Plasticity of bone marrow derived stem cells // *Stem Cells.* 2004. Vol. 22. P. 487–500.
17. Guo Y., Lubbert M., Engelhardt M. CD34-hematopoietic stem cells: current concepts and controversies // *Stem Cells.* 2003. Vol. 21. P. 15–20.
18. Hatano S.Y., Tada M., Kimura H. et al. Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity // *Mech Dev.* 2005. Vol. 122. P. 67–79.
19. Hattan N., Kawaguchi H., Ando K. et al. Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice // *Cardiovasc. Res.* 2005. Vol. 65. P. 334–344.
20. Heng B.C., Haider H.K., Sim E.K. et al. Comments about possible use of human embryonic stem cell derived cardiomyocytes to direct autologous adult stem cells into the cardiomyogenic lineage // *Acta Cardiol.* 2005. Vol. 60. P. 7–12.
21. Hodgson D.M., Behar A., Zingman L.V. et al. Stable benefit of embryonic stem cell therapy in myocardial infarction // *Am J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2004. Vol. 287. P. H471–H479.
22. Isner J.M. Myocardial gene therapy // *Nature.* 2002. Vol. 415. P. 234–239.
23. Kajstura J., Rota M., Whang B. et al. Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion // *Circ. Res.* 2005. Vol. 96. P. 127–137.
24. Kaushal S. et al. Functional small-diameter neovessels created using endothelial.
25. Khurana R., Simons M. Insights from angiogenesis trials using fibroblast growth factor for advanced arteriosclerotic disease // *Trends Cardiovasc. Med.* 2003. Vol. 13. P. 116–122.
26. Kofidis T., deBruin J.L., Yamane T. et al. Stimulation of paracrine pathways with growth factors enhances embryonic stem cell engraftment and host-specific differentiation in the heart after ischemic myocardial injury // *Circulation.* 2005. Vol. 111. P. 2486–2493.
27. Koh C.J., Atala A. Tissue engineering, stem cells, and cloning: opportunities for regenerative medicine // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004. Vol. 15. P. 1113–1125.
28. Landry D.W., Zucker H.A. Embryonic death and the creation of human embryonic stem cells // *J. Clin. Invest.* 2004. Vol. 114. P. 1184–1186.
29. Leong F.T., Freeman L.J. Acute renal infarction // *J. R. Soc. Med.* 2005. Vol. 98. P. 121–122.
30. Levenberg S., Golub J., Amit M. et al. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 2002. Vol. 99. P. 4391–4396.
31. Li R.K., Jia Z.Q., Weisel R.D., Merante F., Mickle D.A. Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function // *J. Mol. Cell Cardiol.* 1999. Vol. 31. P. 513–522.
32. Lunde K., Solheim S., Aakhus S. et al. Exercise capacity and quality of life after intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction: results from the Autologous Stem cell Transplantation in Acute Myocardial Infarction (ASTA-

- MI) randomized controlled trial // *Am. Heart J.* 2007. Vol. 154. P. 710.e1–710.e8.
33. *Majka S.M. et al.* Distinct progenitor populations in skeletal muscle are bone marrow.
  34. *Martin M.J., Muotri A., Gage F., and Varki A.* Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid // *Nat. Med.* 2005. Vol. 11. P. 228–232.
  35. *Menasche P.* Skeletal muscle satellite cell transplantation // *Cardiovasc. Res.* 2003. Vol. 58. P. 351–357.
  36. *Morrison S.J., Weissman I.L.* The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype // *Immunity.* 1994. Vol. 1. P. 661–673.
  37. *Napoli C. et al.* Therapeutic targeting of the stem cell niche in experimental hindlimb ischemia // *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 2008. Vol. 5. P. 571–579.
  38. *Odorico J.S., Kaufman D.S., Thomson J.A.* Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines // *Stem Cells.* 2001. Vol. 19. P. 193–204.
  39. *Osawa M., Nakamura K., Nishi N. et al.* *In vivo* self-renewal of c Kit+ Sca-1+Lin(low/-) hematopoietic stem cells // *J. Immunol.* 1996. Vol. 156. P. 3207–3214.
  40. *Otani A. et al.* Bone marrow derived stem cells target retinal astrocytes and can promote or inhibit retinal angiogenesis // *Nat. Med.* 2002. Vol. 8. P. 1004–1010.
  41. *Palermo A.T., Labarge M.A., Doyonnas R., Pomerantz J., and Blau H.M.* Bone marrow contribution to skeletal muscle: a physiological response to stress // *Dev Biol.* 2005. Vol. 279. P. 336–344.
  42. *Pera M.F., Trounson A.O.* Human embryonic stem cells: prospects for development // *Development.* 2004. Vol. 131. P. 5515–5525.
  43. *Pittenger M.F., Martin B.J.* Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics // *Circ. Res.* 2004. Vol. 95. P. 9–20.
  44. *Rao M., Condic M.L.* Alternative Sources of Pluripotent Stem Cells: Scientific Solutions to an Ethical Dilemma // *Stem Cells and Development.* 2008. Vol. 17. № 1. P. 1–10.
  45. *Reyes M. et al.* Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow // *J. Clin. Invest.* 2002. Vol. 109. P. 337–346.
  46. *Sata M. et al.* Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis // *Nat. Med.* 2002. Vol. 8. P. 403–409.
  47. *Schachinger V., Erbs S., Elsasser A. et al.* (2006). Improved clinical outcomes after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial // *Eur. Heart J.* 2006. Vol. 27. P. 2775–2783.
  48. *Schulinder M., Yanuka O., Itskovitz-Elder J., Melton D., Benvenisty N.* Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 2000. Vol. 97. P. 11307–11312.
  49. *Shizuru J.A., Negrin R.S., Weissman I.L.* Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system // *Annu Rev Med.* 2005. Vol. 56. P. 509–538.
  50. *Silva G.V., Litovsky S., Assad J.A.R., Sousa A.L.S. et al.* Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model // *Circulation.* 2005. Vol. 111. P. 150–156.
  51. *Smith J.R., Pochampally R., Perry A., Hsu S.C., Prockop D.J.* Isolation of a highly clonogenic and multipotential subfraction of adult stem cells from bone marrow stroma // *Stem Cells.* 2004. Vol. 22. P. 823–831.
  52. *Takeda Y., Mori T., Imabayashi H., Kiyono T. et al.* Can the life span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation? // *J. Gene Med.* 2004. Vol. 6. P. 833–845.
  53. *Tzukerman M., Rosenberg T., Ravel Y. et al.* An experimental platform for studying growth and invasiveness of tumor cells within teratomas derived from human embryonic stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 2003. Vol. 100. P. 13507–13512.
  54. *Wang J.S., Shum-Tim D., Chedrawy E. et al.* The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiological and therapeutic implications // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2001. Vol. 122 (4). P. 699–705.
  55. *Weissman I.L., Anderson D.J., Gage F.* Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations // *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001. Vol. 17. P. 387–403.
  56. *Yamada S., Nelson T.J., Crespo-Diaz R.J. et al.* Embryonic stem cell therapy of heart failure in genetic cardiomyopathy *Stem Cells.* 2008. Vol. 26 (10). P. 2644–2653.
  57. *Yoon Y.S., Wecker A., Heyd L., Park J.S. et al.* Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction // *J. Clin. Invest.* 2005. Vol. 115. P. 326–338.
  58. *Young P.P., Hofling A.A., Sands M.S.* VEGF increases engraftment of bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPCs) into vasculature of newborn murine recipients // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. Vol. 99. P. 11951–11956.
  59. *Yuasa S., Itabashi Y., Koshimizu U., Tanaka T. et al.* Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells // *Nat. Biotechnol.* 2005. Vol. 23. P. 607–611.
  60. *Zhang M., Methot D., Poppa V., Fujio Y. et al.* Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies // *J. Mol. Cell Cardiol.* 2001. Vol. 33. P. 907–921.