

Renal Allograft Disease Registry (RADR).

Transplantation 1999;68:635—41.

29. Savin V.J., Sharma R., Sharma M. et al. Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis.

N Engl J Med 1996;334:878—83.

30. Andresdottir M.B., Assman K.J., Hojstma A.J. et al. Renal transplantation in patients with dense deposit disease: morphological characteristics of recurrent disease and clinical outcome.

Nephrol Dial Transplant 1999;14:1723—31.

31. Couser W. Recurrent glomerulonephritis in the renal allograft: an update of selected areas. Exp Clin Transplant 2005;1:283—8.

32. Hariharan S., Smith R.D., Viero R. et al. Diabetic nephropathy after renal transplantation. Transplantation 1996;62:632—5.

33. Bhalla V., Nast C.C., Stollenwerk N. et al. Recurrent and de novo diabetic nephropathy in renal allografts. Transplantation 2003;75:66—71.

34. Truong L., Gelfand J., D'Agati V. et al. De

novo membranous glomerulonephropathy in renal allografts: a report of 10 cases and review of the literature. Am J Kidney Dis 1989;14:131—44.

35. Byrne M.C., Budisavljevic M.N., Fanz Z. et al. Renal transplant in patients with Alport's syndrome. Am J Kidney Dis 2002;39:769—75.

36. Querin S., Noel L.H., Grunfeld J.P. et al. Linear glomerular IgG fixation in renal allografts: Incidence and significance in Alport's syndrome. Clin Nephrol 1986;25:134—40.

## Заместительная клеточная терапия

В.Б. Хватов, А.Ю. Ваза, Е.А. Жиркова, В.С. Бочарова

НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва

### Cell Replacement Therapy

V.B. Khvatov, A.Yu. Vaza, Ye.A. Zhirkova, V.S. Bocharova

N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Care, Moscow

*Cell replacement therapy is regarded as a way of correcting functional incompetence of organs and tissues in their injury. This area has been identified as an independent clinical discipline. Intensive studies of the biological stem cells (SCs) have provided strong evidence for the universal flexibility of these cells that were able to repopulate damaged tissues. Today's capabilities have substantially kept ahead of the level of our knowledge about the biology of SCs. However, incontrovertible warranties as to the biological safety of grafting of these cells have not been obtained so far. In this connection, it is proposed to stimulate resident SCs of adult tissues in injury, by creating conditions for realizing their regeneration potential.*

**Key words:** stem cell, tissue regeneration, cell therapy.

В XX в. бурно развивались и начали активно применяться в клинической практике методы восстановительного лечения поврежденных органов и тканей, использующие трансплантацию донорских органов и тканей. Благодаря крупнейшим достижениям молекулярной и клеточной биологии открыты широкие перспективы для разработки принципиально новых технологических приемов, предназначенных для лечения заболеваний человека, — клеточной и генной терапии. Современные технические возможности длительного культивирования диплоидных клеток млекопитающих послужили основой для реализации теоретических представлений о возможности использования искусственно размноженных клеток с терапевтическими целями.

Метод клеточной трансплантации рассматривается как способ коррекции функциональной несостоятельности органов и тканей при травме и ряде заболеваний. Такие повсеместно используемые медицинские манипуляции, как компонентная гемотерапия, экстракорпоральная гемокоррекция, а также трансплантация костного мозга, бесспорно, относятся к методам клеточной терапии. В настоящее время заместительная клеточная терапия (ЗКТ) сформировалась в самостоятельное клиническое направление, основанное на введении в организм пациента живых аутологичных, аллогенных и ксеногенных клеток для направленного терапевтического воздействия на организм с целью восстановления или замены утраченной функции органа или ткани [1].

В России принята Федеральная целевая научно-техническая программа «Новые клеточные технологии — медицине», включающая разработку биомедицинских технологий получения и использования клеточного материала, создание банков как соматических, так и стволовых клеток

(СК) для применения в медицинской практике. Бурное развитие методов длительного культивирования СК, клеток-предшественников и соматических клеток, выделяемых из тканей эмбрионов, плодов и взрослых организмов животных и человека, определило возможность применения технологий ЗКТ при неотложных состояниях.

Первым примером применения ЗКТ в хирургической практике является использование клеток эпидермиса, кератиноцитов, для заживления ожоговых ран [2]. В клиниках развитых стран мира с 80-х годов XX в. искусственно выращенные аутокератиноциты стали применять для лечения больных с обширными ожоговыми поражениями кожи [3]. Однако, как показал накопленный опыт, предложенный метод имеет ряд существенных недостатков, в частности длительность и исключительную трудоемкость подготовки к пересадке аутоотрансплантатов и неудовлетворительные результаты приживления культивированных кератиноцитов (дискератоз, отслоение).

Аллогенные кератиноциты на ране служат только временным биологическим покрытием, стимулируя пролиферацию собственного эпителия пациента [4]. Кроме того, высокая стоимость трансплантатов, содержащих живые культивированные кератиноциты, и ограниченный срок их пригодности для использования препятствуют широкому распространению данного метода.

При обширных повреждениях кожи восстановление дермы является ключевым этапом раневого заживления. В 90-е годы XX в. коллективом авторов Института хирургии им. А.В. Вишневского РАМН был предложен и внедрен в клиническую практику патогенетически обоснованный метод лечения обширных ожоговых ран, основанный на использовании культуры аллогенных фибробластов, клеток со-

единительной ткани [5]. Метод оказался достаточно эффективным и более доступным, чем культивирование кератиноцитов, что способствовало его распространению в клиниках.

Использование мезенхимальных клеток костного мозга для лечения ран кожи не показало качественного их преимущества [6]. Все эти типы клеток производят молекулы межклеточного матрикса, цитокины, хемокины и факторы роста, которые служат ключевыми стимуляторами регенерации кожи.

Разработанные методы лечения ожоговых ран с применением культивированных клеток кожи и ее эквивалентов значительно расширили возможности местного лечения обожженных пациентов, однако проблема полноценного восстановления кожи по-прежнему не теряет своей актуальности [7].

В 1908 г. А.А. Максимов впервые использовал термин «стволовая клетка», описывая свойства недифференцированных клеток-родоначальниц, обеспечивающих развитие и поддержание всех гемопоэтических линий [8]. Сегодня известно, что ткани взрослого организма содержат резидентные тканеспецифические СК, обеспечивающие их физиологическую регенерацию [9]. В настоящее время резидентные СК обнаружены во многих органах и тканях млекопитающих: центральной и периферической нервной системе, сетчатке, роговице, эпителии кожи и кишечника, костном мозге, периферической крови, пульпе зуба, мышце, печени, жировой ткани и др. Интенсивные экспериментальные исследования последних 15–20 лет, выполненные на животных с различными патологиями, представили убедительные данные об универсальной способности взрослых СК репопулировать различные поврежденные ткани, что послужило основой для представления концепции о пластичности СК взрослого организма.

Журнал «Science», анализируя крупнейшие научные открытия XX в., признал открытие СК 3-м по значимости событием в биологии после открытия двойной спирали ДНК и расшифровки генома человека, заставившим переосмыслить некоторые фундаментальные положения биологической науки. Уникальность биологических свойств СК заключается в том, что в эмбриогенезе они определяют развитие всех тканей организма, а в постнатальном онтогенезе обеспечивают постоянное поддержание клеточного гомеостаза тканей и органов. Однако накопленные нами знания о природе СК и молекулярном уровне управления клеточной судьбой не способны объяснить, почему под влиянием внешнего окружения коммитирование ее потомков может происходить по разным направлениям. Несмотря на неполноту теоретических представлений о биологии СК, значительный прогресс в технологиях выявления, сепарации и тиражирования СК привел к тому, что в настоящее время основные надежды клеточных технологий лечения связывают с применением СК [10]. Показано, что эмбриональные СК в искусственных условиях культивирования обладают способностью к неограниченному делению и под влиянием соответствующего химического индуктора могут дифференцироваться в специализированные клетки всех 3 зародышевых эмбриональных листков. Биологические свойства эмбриональных СК определяют простые и экономичные технологии макромасштабного выращивания специализированных клеток человека *in vitro*, но только расшифровка механизмов управления направленной дифференцировкой потомков эмбриональной СК как *in vitro*, так

*in vivo* позволит решить основные проблемы получения необходимого клеточного материала в требуемом количестве для лечения различных заболеваний человека. Несмотря на то что в настоящее время в мире получено несколько сотен бессмертных линий эмбриональных СК, которые можно использовать для получения различных типов дифференцированных клеток, ряд нерешенных ключевых биологических и морально-этических проблем, связанных с использованием эмбриональных СК, налагает запрет на клиническое применение этого материала с лечебными целями.

Кроветворные СК костного мозга уже на протяжении десятилетий успешно используют для восстановления кроветворения у пациентов с онкологическими и гематологическими заболеваниями. В пилотных клинических исследованиях применяли мезенхимальные клетки в лечении инфаркта миокарда, инсульта, цирроза печени, нейродегенеративных заболеваний, травм головного и спинного мозга, повреждений скелета, эндокринных заболеваний и др. [11, 12]. Однако анализ полученных результатов выявил множество проблем, связанных как с техническими моментами (выделение, размножение, способ введения), так и с биологическими свойствами СК (устойчивость их генома при форсированном размножении в искусственных условиях, механизмы навигации, заселения — хоуминга и удержания СК в своих нишах) [12, 13]. Кроме того, до настоящего времени не получили должного объяснения такие явления, как слияние СК с другими клетками, гетерогенность популяций СК в костном мозге, крови и других СК. Без детального понимания процессов, управляющих поведением СК, невозможно обеспечить биологическую безопасность терапевтического использования взрослых СК в клинической практике.

В настоящее время практически нет сомнений в том, что циркулирующие в кровотоке и резидентные тканевые СК взрослого организма являются клеточными элементами, обеспечивающими регенерацию органов и тканей при их повреждении. Показано, что главным образом микроокружение (физико-химический состав среды) СК определяет характер ее функционирования — бездействие/деление. Среди многочисленных сигналов, воспринимаемых СК, особо выделяют роль межклеточного матрикса, формирующего нишу СК и являющегося интерактивным держателем факторов управления (ростовые факторы, цитокины, ионы и др.). Кроме того, именно макромолекулы межклеточного матрикса обеспечивают правильное закрепление клеток и направленное их движение в зону повреждения при травме.

Ожоговая рана в соответствии с основными закономерностями течения раневого процесса характеризуется рядом особенностей, зависящих от глубины и площади поражения. Ожог IIIa степени является своеобразной границей, разделяющей способность к самостоятельной эпителизации ожоговой раны, когда сохранившиеся СК кожи обеспечивают заживление, от необходимости трансплантации аутокожи для ее закрытия при уничтожении резидентных СК. Известно, что СК волосных фолликулов, сальных и потовых желез активно репопулируют эпидермис в случае его повреждения [14]. Именно эта популяция резидентных СК обеспечивает самостоятельную эпителизацию ожогов IIIa степени в течение 20–25 сут. Однако в результате тепловой деструкции дермы (денатурация межклеточного матрикса, приводящая к извращению молекулярных механизмов взаимодействия клеток, участвующих в раневом процессе) заживление происходит гипертрофированным рубцом с нестабильным закрепле-

нием эпидермиса, что связывают с неадекватностью белкового и клеточного состава поврежденного матрикса дермы.

О благоприятном влиянии факторов роста и цитокинов на заживление ран свидетельствуют многочисленные клинико-экспериментальные данные. Среди них особое место занимает тромбоцитарный фактор роста (PDGF-BB), который является мощным хемоаттрактантом и митогеном для фибробластов, синтезирующих широкий спектр макромолекул межклеточного матрикса [15].

Эти сведения послужили предпосылкой к применению коллагенового матрикса, дополненного ростовыми факторами, для стимуляции резидентных СК кожи к активной пролиферации, обеспечивающей эпителизацию обширных ожоговых ран. Мы предположили, что привнесение в ожоговую рану IIIa степени экзогенного коллагена типа I с PDGF-BB для привлечения фибробластов из неповрежденных тканей должно стимулировать регенерацию эпителия. Кроме того, показано, что в первые сутки после травмы в экссудате ожоговой раны присутствуют в значительном количестве факторы роста и другие биологические активные соединения, концентрация и соотношение которых постоянно изменяются и прогрессивно снижаются во времени [16]. Поэтому пролонгированное выделение экзогенного PDGF-BB из коллагеновой губки значительно усиливает раностимулирующие свойства биологической повязки на основе коллагена. Использование более чем у 100 пациентов для лечения ожогов IIIa степени повязок на основе коллагена типа I с PDGF-BB продемонстрировало их высокую эффективность [17]. Сравнительный клинический анализ эффективности биологических покрытий показал, что влияние коллагеновой повязки с PDGF-BB и живых культивированных фибробластов на заживление ожоговых ран IIIa степени оказалось практически равнозначным. Полагаем, что эффективность биологических повязок в значительной мере обусловлена временем их применения — 1–2-е сутки после травмы, когда высокая стимулирующая пролиферацию кератиноцитов активность раневого экссудата дополняется матриксным белком повязок и хемоаттрактантом, влияющим на поступление в зону ранения фибробла-

стов из окружающих неповрежденных тканей, что является необходимым для ремоделирования поврежденной дермы.

Другим свидетельством состоятельности предположения о важности межклеточного матрикса для проявления функций резидентных СК при восстановлении/регенерации поврежденной ткани послужили эксперименты, в которых изучались хондроиндуктивные свойства коллагенового матрикса с костным морфогенетическим белком (BMP) на модели внутрисуставного повреждения хряща у крыс. Полученные результаты свидетельствуют о том, что у крыс с большим остеохондральным дефектом мышелка бедренной кости происходит восстановление гиалинового хряща по всему объему дефекта. Мы полагаем, что привнесение в зону повреждения коллагена с BMP способствовало быстрой доставке мезенхимальных клеток костного мозга в хрящевую рану, кроме того, ростовой фактор обуславливал направление их дифференцировки в хондроциты гиалинового хряща [18].

Приведенные примеры иллюстрируют возможность непосредственного управления при травме поведением резидентных тканевых СК *in situ*. Мы предполагаем, что естественные биологические события, развивающиеся в зоне повреждения, т.е. спонтанная активация пролиферации тканевых СК, дополняется предлагаемым экзогенным воздействием, способствующим наиболее оптимальной реализации их регенераторного потенциала.

Широкие технические возможности сегодняшнего дня значительно превышают уровень наших знаний о биологии СК. Несмотря на исключительно бурное и разностороннее развитие исследований СК, недостаток теоретических представлений о биологических свойствах этих клеток резко ограничивает их клиническое использование, так как до настоящего дня не получены бесспорные гарантии их биологической безопасности при трансплантации. Оптимизм относительно лечебного потенциала СК необходимо адекватно соотносить с мерой ответственности при их конкретном применении.

Можно заключить, что клеточные технологии — новая многообещающая и исключительно интересная отрасль современной медицины и ее развитие определит будущее медицины ближайших десятилетий.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Шевченко Ю.Л. Медико-биологические и физиологические основы клеточных технологий в сердечно-сосудистой хирургии. СПб.: Наука, 2006.
2. Rheinwald J., Green H. Epidermal growth factor and multiplication of culture human epidermal keratinocytes. *Nature* 1977;265:421–5.
3. Gallico G.G., O'Connor N.E., Compton C.C. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med* 1984;311:448–51.
4. Васильев А.В. Клеточные механизмы репарации тканевых повреждений. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М., 2003.
5. Саркисов Д.С., Алексеев А.А., Глушенко Е.В. и др. Теоретические и практические аспекты использования культивированных фибробластов при восстановлении целостности кожных покровов. *Вестн РАМН* 1994;(6):6–11.
6. Расулов М.Ф., Васильченко А.В., Онищенко Н.А. и др. Первый опыт применения мезенхимальных клеток костного мозга для лечения большой с глубокими ожоговыми ранами кожи. *Клет технол в биол и мед* 2005;(1):42–6.
7. Green H. Cultured cells for the treatment of disease. *Sci Am* 1991;165(5):96–102.
8. Maximow A.A. Relation of blood cells to connective tissues and endothelium. *Physiol Rev* 1924;4:533–63.
9. Фриденштейн А.Я., Чайлахян Р.К., Герасимов Ю.В. Cell tissue kinetics 1987;20:263–72.
10. Репин И.С., Ржанникова А.А., Шаменков Д.А. Эмбриональные стволовые клетки: фундаментальная биология и медицина. М.: РеМетекс, 2002.
11. Бочков Н.П. Клеточная терапия в свете доказательной медицины. *Клин мед* 2006;(10):4–10.
12. Ярыгин К.Н. Роль резидентных и циркулирующих стволовых клеток в физиологической и репаративной регенерации. *Пат физиол экспер терапия* 2008;(1):2–7.
13. Бочков Н.П., Воронина Е.С., Косякова Н.В. и др. Хромосомная изменчивость мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека. *Клет технол в биол и мед* 2007;(1):11–5.
14. Ito M., Liu Y., Yang Z. et al. Stem Cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not homeostasis of the epidermis. *Nature Medicine* 2005;11:1351–4.
15. Xu J., Clark R.A.F. Extracellular matrix alter PDGF regulation of fibroblast integrins. *J Cell Biology* 1996;132(1):239–49.
16. Воронкина И.В., Калмыкова Н.В., Шарлаимова И.А. и др. Изменение биологической активности ожогового экссудата человека в ходе заживления ожога. *Цитология* 2004;46(4):361–75.
17. Сычевский М.В., Истранов Л.П., Смирнов С.В. Биологическая повязка на основе коллагена типа I с тромбоцитарным фактором роста в лечении ожоговых ран IIIa степени. *В Московская ассамблея «Здоровье столицы»* М., 2006. с. 197.
18. Ваза А.Ю., Истранов Л.П., Шехтер А.Б., Канаков И.В. Разработка метода стимуляции заживления костно-хрящевых дефектов в эксперименте. *Здравоохранение и мед технологии* 2008;(1):8.