



Лобынцева Г. С.

Институт клеточной терапии, Киев, Украина

## ОБЗОР ДОКЛАДОВ 3-ГО МЕЖДУНАРОДНОГО СИМПОЗИУМА, ПОСВЯЩЕННОГО КЛИНИЧЕСКОМУ ПРИМЕНЕНИЮ ПЛАЦЕНТАРНЫХ И ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

С 10 по 12 сентября в Гранаде (Испания) проходил 3-й Международный симпозиум 3<sup>rd</sup> IPLASS Meeting, посвященный клиническому применению плацентарных и эндометриальных стволовых клеток. Организатором симпозиума было Международное общество плацентарных стволовых клеток (IPLASS) во главе с президентом доктором *Ornella Parolini* (Италия). Было заслушано 29 докладов и представлено 25 стендовых сообщений. Научные и клинические учреждения Италии, Соединенных Штатов Америки, Австралии, Австрии, Нидерландов, Швеции, Израиля, Индии, Португалии, Испании, Франции, Аргентины, Бразилии, Японии, Китая, Чили, Германии занимаются исследованиями характеристик стволовых клеток, выделенных из плаценты. Особенно было приятно то, что учеными из Украины (*Институт клеточной терапии, Киев*) было сделано три доклада, научная ценность которых была отмечена дипломом и премией.

Значимость плаценты как органа понятна всем, однако, многие аспекты ее функционирования стали известны лишь в последние 5-7 лет. Основные направления исследований включали качественные и количественные характеристики выделенных из плаценты клеток, оценку влияния условий их получения и хранения, а также результаты доклинических и клинических испытаний клеточных препаратов. Во многих работах было показано, что плацентарные мультипотентные стромальные клетки (МСК) обладают уникальными свойствами: они способны дифференцироваться в нескольких направлениях, давая в культуре адипоциты, остеоциты и хондроциты; они проявляют иммуно-регуляторные свойства и оказывают влияние на многие клеточные процессы. МСК, выделенные из ворсин хориона (*hCV-MSC*) и плодовых оболочек (*hAMSCs*), имеют типичные для МСК маркеры (экспрессируют *CD105*, *CD73*, *CD90* при отсутствии гемопозитических маркеров). Кариотипирование, сравнительная геномная гибридизация и генотипирование свидетельствуют о высокой стабильности генома после наращивания этих клеток в культуре.

Если посмотреть на соавторство представленных докладов, становится ясным, что это очень глубокие исследования и проведены они в основном при выполнении совместных грантов учеными из различных научных центров. В частности, в докладе *J. Patel*, представившего результаты группы исследователей из *Центра клиничес-*

*ких исследований Университета Квинсленда (Австралия) и Школы медицины Национального университета Сингапура (Сингапур)*, было показано, что из одной плаценты человека можно получить такое же количество эндотелиальных колониеобразующих клеток (*ECFC*), как из 27 донорских образцов кордовой крови. Выращенные в культуре клетки не отличались от нативных по пролиферативному потенциалу, имели минимальные отличия в профиле экспрессии генов и были способны восстанавливать ишемическое повреждение конечностей у мышей.

Совершенно недавно было показано, что плацента является органом кроветворения, потому сравнительное изучение свойств кроветворных клеток, выделенных из костного мозга, кордовой крови, эмбриональной печени плаценты различных сроков гестации, представляет не только научный, но и огромный интерес в плане их практического применения в клинической практике. Эти исследования были выполнены коллективом ученых из Украины и прозвучали в докладе М. Кучмы. Установлено, что плацентарные кроветворные клетки по уровню экспрессии поверхностных маркеров близки к клеткам эмбриональной печени и содержат больше клеточных предшественников, чем в кордовой крови. Кроме того, кроветворные клетки, выделенные из плаценты, замороженной по разработанной авторами программе, по своим свойствам и репопуляционному потенциалу не отличаются от клеток, выделенных из не замороженной плаценты. В количественном соотношении из плаценты можно получить больше кроветворных клеток, чем из одного образца кордовой крови. Эти результаты свидетельствуют о том, что плацента может быть дополнительным источником кроветворных клеток, что очень важно при лечении онкогематологических патологий.

Для того чтобы пролить свет на механизмы регенеративной способности в естественных условиях человеческих мезенхимальных стволовых клеток (*hMSCs*), *C. Wu* и *L. Deng (Sichuan University, Китай)* применяли методы долгосрочного наблюдения за плацентарными децидуальными базальными МСК (*placenta decidua basalis MSC – PDB-MSC*) по отслеживанию расселения клеток с помощью мечения тимидина радиоизотопным углеродом <sup>14</sup>C. Также были исследованы характеристики этих клеток: морфология, колониеобразующая способность, возможности дифференцировки, кариотип и клеточный цикл. Для исследований  $1 \cdot 10^6$  <sup>14</sup>C-TdR меченных *PDB-MSC* вводили

внутривенно мышам и исследовали органы через 1, 2, 3, 5 и 30 суток. Радиоактивные *PDB-MSC* были найдены преимущественно в легких, селезенке, печени, желудке, левой бедренной кости и костном мозге реципиента. В этой работе было доказано, что <sup>14</sup>C-*TdR* маркировка не меняет биологических характеристик МСК человека и данный метод может быть применен для количественного определения слияния клеток в долгосрочных доклинических исследованиях.

*H. Kaipe* и соавт. (*Karolinska Institutet*, Швеция) исследовали терапевтические возможности децидуальных стромальных клеток (*decidua stromal cells – DSC*) при врожденном буллезном эпидермолизе Херлица (*Junctional epidermolysis bullosa, Herlitz type*). Данное заболевание вызвано дефицитом ламинина-332 и приводит к опасным для жизни повреждениям кожи и слизистой оболочки. Показано, что инфузии клеток амниотической мембраны и *DSC* могут улучшить процесс заживления волдырей, тяжелых ран на локтях, в паху и на лице у пациентов. Но при этом *DSC* способны вызвать образование мультиспецифических анти-HLA антител у пациентов с нормальной иммунной системой, а также возможен риск аллоиммунизации пациентов с ослабленным иммунитетом.

Доклад *В. Шаблия* и соавт. (*Институт клеточной терапии*, Украина) был посвящен изучению фенотипа и терапевтических свойств мультипотентных клеток трофобласта (*multipotent trophoblast cells – MTCs*), которые были охарактеризованы с помощью проточной цитометрии, иммуноцитохимии и количественной ПЦР. Плацентарная ткань, из которой выделяли клетки, была криоконсервирована по разработанной авторами программе. Для исследования терапевтических свойств *MTCs* в поврежденной сердечной ткани была использована изопротеренол-индуцированная модель кардиомиопатии у мышей линии *FVB*. Впервые было установлено, что плацентарные *MTCs* одновременно экспрессируют мезенхимальные и трофобластные маркеры, а также содержали цитокератин-7-положительные (*CK7<sup>+</sup>*) и *CK7*-предшественники. Клетки, выделенные из замороженной ткани, имели иммунофенотип, сходный с иммунофенотипом нативной ткани. Введенные внутривенно животным с кардиомиопатией, клетки были обнаружены в миокарде на 2-й и 28-й день. Эта работа представляет большой интерес, так как еще никто не описывал наличие стволовых клеток трофобласта в плаценте.

В докладе *А. Свитиной* и соавт. (*Институт клеточной терапии*, Украина) были представлены результаты воздействия стволовых трофобластных клеток (*TSC*), выделенных из плаценты, при лечении колоректального рака у крыс. Был исследован фенотип используемых нативных и криоконсервированных *TSC*. Аллогенная внутривенная трансплантация клеток при диметилгидразин-индуцированном колоректальном раке вызывала подавление роста опухоли с дозозависимым эффектом. В то же время при ксеногенной трансплантации никакого эффекта не наблюдали.

Несколько докладов и стендовых сообщений были посвящены исследованию стволовых клеток, выделенных из амниотической жидкости и ткани амниона. Внутренний слой амниотической мембраны человека (*human amniotic membrane – hAM*) состоит из плодных оболочек, которые, как правило, утилизируются после рождения как части плаценты. Это полупрозрачная и очень гибкая структура без нервов, мышц, лимфатических сосудов, состоящая из амниотического эпителия и околоплодных мезенхимальных стромальных клеток в безсосудистой мезенхиме. *hAM* обладает несколькими важными свойствами: бактериостатическое действие, антиангиогенное, обезболивающее, противомембранное, противовоспалительные эффекты, способствует заживлению ран и их эпителизации, проявляя при этом низкую иммуногенность.

Некоторые исследования продемонстрировали противораковое действие амниотической мембраны человека. Это совсем недавние доклинические исследования, поскольку клеточные механизмы, ответственные за противораковые свойства *AM*, еще плохо изучены. В работе, представленной *А. Мамеде* и соавт. (*University of Coimbra*, Португалия), исследован противораковый потенциал экстракта *hAM*

(*hAM-E*) на человеческой гепатоцеллюлярной карциноме и установлено, что клеточная линия *HepG2* более чувствительна к лечению *hAM-E*, чем клетки линии *HuH7*. Похоже, что полученный препарат может иметь несколько мишеней в раковых клетках. Сделан вывод о важной роли экстракта и о необходимости в будущем соединить полученную информацию с наблюдаемыми клеточными механизмами, тем самым способствуя выяснению потенциала *hAM* в онкологии.

В другой работе *S. Guerra* и соавт. (*University of Coimbra*, Португалия) показано, что человеческая амниотическая мембрана выделяет несколько цитотоксических цитокинов и интерлейкины. Факторы, выделяемые *hAM*, не могут уменьшить метаболическую активность клеточных линий. Тем не менее, кондиционированная среда (*KC*) *AM* усиливает эффект 5-фторурацила, доксорубина и сорафениба в клетках линии *HuH7*. С другой стороны, *KC* ингибирует цитопатическое действия цисплатина на клетки *HuH7*. Аналогичные результаты также наблюдались в клетках *HepG2*. В клеточной линии *Hep3 B2.1-7* *KC* потенцируют действие доксорубина, но ингибируют эффект цисплатина и не способны стимулировать или ингибировать эффект 5-фторурацила и сорафениба. По-видимому, *KC* по-разному действуют на клетки, и это важно не только для того, чтобы доказать, что *KC* может усиливать действие обычной химиотерапии, но также для выяснения путей воздействия *hAM* на канцерогенез.

*L. Verbeeck* и соавт. (*University of Antwerp*, Бельгия) было исследовано взаимодействие *hAM* со стволовыми клетками (*hASC*), полученными из жировой ткани человека, которые имеют большое значение для тканевой инженерии. Были апробированы различные методы выделения стволовых клеток из амниотической оболочки, а также впервые создана совместная культура *hAM* с *hASC*.

С 2007 года служба переливания крови Красного Креста Австралии по нескольким показаниям поставляет криоконсервированные амниотические оболочки из банков тканей в некоторые больницы. В доклинических исследованиях. *S. Hennerbichler* и соавт. (*Служба переливания крови Красного Креста*, Австрия) криоконсервированная *hAM* была испытана в качестве антиадгезионного покрытия при офтальмологических заболеваниях. Антифиброзные свойства были показаны на модели фиброза в печени крыс. Получены хорошие результаты при клиническом исследовании применения амниотической мембраны для покрытия участков ожогов кожи, а также другие перспективные области применения *hAM* (например, лечение патологий орбиты, ороназальных свищей и т.д.).

Для уменьшения потенциального риска послеоперационных инфекций через трансплантации амниотической оболочки *I. Lindlbauer* и соавт. (*Служба переливания крови Красного Креста*, Австрия) предложили методику обработки ткани с параллельными микробиологическими исследованиями различными методами и материалами. Такой подход был осуществлен для повышения чувствительности путем минимизации ошибки определения стерильности.

*T. Gualdi* и соавт. (*Университет Franche-Comté*, Франция) пытались использовать человеческую амниотическую мембрану в качестве перспективного терапевтического лекарственного средства для восстановления кости. Сделан вывод о том, что ее остеогенная дифференцировка не оказывает существенного влияния на иммуногенность и нативная *hAM* может быть использована для восстановления костей. Также авторами были определены критерии банкирования амниона по оценке влияния условий хранения на свойства клеток.

В исследовательском центре *им. Е. Мени г. Брешиа* (Италия) провели анализ структурного и ультраструктурного уровня *hAM* для того, чтобы лучше понять морфологию, функцию и возможности использования ее клеток для тканевой инженерии. В частности, от центра к периферии эпителий *hAM* изменяется от сквамозного эпителия, у которого наблюдается отслаивание клеток, до монослой кубической и цилиндрических клеток, обладающих секреторной активностью. Иммуноцитохимическая окраска толлуидином синим полутонких

срезом указала на наличие липидных капель в эпителиальных и мезенхимальных клетках.

*M. Marongiu* и соавт. (*Università degli Studi di Cagliari*, Италия) показали, что амниотические эпителиальные клетки (human amnion epithelial cells – *hAECs*), полученные из плаценты человека, могут быть использованы для регенерации печени. В предыдущих исследованиях на модели репопуляции печени крысы было показано, что после трансплантации они могут дифференцироваться в гепатоцитоподобные клетки и зрелые гепатоциты. Авторы высказали предположение о том, что этот процесс может происходить без слияния донорских клеток с клетками хозяина.

Стволовые клетки, полученные из амниотического эпителия, показали большой восстановительный потенциал при лечении различных патологических состояний, включая травмы спинного мозга (*S. Venkatachalam* и соавт., *Университет Мадраса*, Индия). Будучи клетками плодового происхождения, *hAECs* демонстрируют высокие скорости деления и пластичность, а также иммунную толерантность и противовоспалительные свойства. Для них доказаны иммуномодулирующие свойства в подавлении пролиферации лимфоцитов.

Однако, в соответствии с *GMP*, для клинического применения *hAECs* следует культивировать в среде без ксенобиотиков и иммуносупрессоров. В представленном докладе *C. Zannini* и соавт. (*Университет Болоньи*, Италия) было показано, что безсывороточные условия культивирования не изменяют характеристики *hAECs*. Кроме

того, иммуномодулирующие свойства *hAECs* не зависят от условий культивирования и 3D-протокол не влияет на дифференцировку клеток в культуре. Эти наблюдения показывают, что безсывороточные среды могут упростить переход *hAECs* от лабораторных исследований к клиническому применению.

В работе *G. La Rocca* и соавт. (*Университет Палермо*, Италия) было показано что, мезенхимальные стволовые клетки Вартонова геля (*Wharton's jelly MCK – WJ-MSC*) могут дифференцироваться в различные типы клеток и имеют иммуномодулирующие и противовоспалительные свойства, что делает их перспективным инструментом для регенеративной медицины. Исследована возможность использования стволовых клеток Вартонова геля из пуповины для терапии энцефалопатии недоношенных крыс. Показано, что внутрочерепная трансплантация человеческих *WJ-MSC* подавляет сопутствующие гистологические изменения в поврежденном мозге, предположительно за счет механизмов секреции нейротрофических факторов и подавления воспаления, сопровождающего гипоксически-ишемические повреждения головного мозга.

Оргкомитетом была создана комиссия, которая проанализировала заслушанные доклады и стендовые сообщения и на заключительном заседании были отмечены дипломами и премиями три лучших устных и стендовых сообщения молодых ученых. В частности, одним из лучших был признан доклад Владимира Шабля из Украины.



СТАТЬЯ НА САЙТЕ  
TRANSPLANTOLOGY.ORG

*Автор подтверждает отсутствие возможных конфликтов интересов.*

*Поступила в редакцию 06.10.2014 г.*

*Принята к печати 07.11.2014 г.*