**Лекция № 15**

**Современные аспекты концепции стволовых клеток**

*1.Трансплантация кроветворных стволовых клеток при аутоиммунной патологии*

В наше время в клинике действительно широко применяются только взрослые стволовые клетки – причем, не любые, а только кроветворные: речь идет, прежде всего, о трансплантации кроветворных стволовых клеток (ТКСК) при различных формах лейкозов, врожденных болезнях крови и аутоиммунных болезнях. В последние годы начало изучаться применение взрослых стволовых клеток при сахарном диабете 1 типа, а также некоторых других патологиях, однако количество клинических исследований, посвященных данной проблеме, еще слишком мало.

В последние годы ТКСК находит все большее применение при лечении тяжелых форм аутоиммунных заболеваний. В медицине для лечения аутоиммунной патологии уже неоднократно предпринимались попытки элиминации лимфоцитов, индуцирующих или поддерживающих аутоиммунный процесс. Сначала подход к системной элиминации Т-хелперов с помощью анти-CD3- и анти-CD4-антител казался многообещающим, однако из-за тяжелых побочных эффектов оказался неприменим в клинической практике.

За ним последовала методика системной элиминации В-лимфоцитов при помощи рутиксимаба – препарата анти-CD20-антител. Но, поскольку известно, что хроническое аутоиммунное воспаление поддерживается за счет взаимодействий между В-клетками, АПК и Т-хелперами, можно предположить, что после удаления одного участника процесса (В-лимфоцитов) останется интактная популяция клеток памяти противоположного типа (Т-клеток), готовых начать патологический процесс вновь, как только В-лимфоциты вновь восстановятся из стволовых клеток.

Таким образом, элиминация обоих типов лимфоцитов посредством полной иммуноабляции циклофосфамидом в комбинации с антитимоцитарным и антилимфоцитарным глобулинами с последующим проведением ТКСК – единственный подход, способный привести к излечению или стойкой ремиссии тяжелой аутоиммунной патологии.

Этот метод весьма эффективен, хотя и опасен вследствие развития тяжелого иммунодефицита. Для проведения этой процедуры были разработаны различные протоколы, однако все они включают три основных этапа.

Первый – мобилизация кровяных клеток-предшественников на периферии путем болюсной инфузии циклофосфаида и подкожного введения гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора.

 Второй шаг – полная иммуноабляция – высокодозная химиотераия с применением антилимфоцитарных антител или без оных, либо тотальное облучение.

Наконец, финальный этап – введение кровяных клеток-предшественников (чаще аутологичных, но иногда и аллогенных), дающих начало Т- и В-лимфоцитам.

ТКСК во многих случаях дает длительную ремиссию заболевания вплоть до полного излечения, однако сопряжена с определенным риском летального исхода, а также развития реакции отторжения трансплантата.

ТКСК без проведения иммуноабляции (но при поддержке иммуносупрессорной терапии, чтобы предотвратить отторжение) может применяться также для лечения первичных иммунодефицитов – в этом случае вводимые извне стволовые клетки восстанавливают пул лимфоцитов в организме. Однако в большинстве случаев тяжелых комбинированных иммунодефицитов достигается приживление в основном Т-лимфоцитов, в то время как антительный иммунодефицит остается.

ТКСК – метод неспецифичный, поэтому внимание ученых обратилось к изучению свойств отдельных клеточных популяций и осознанию той роли, какую они играют в индукции иммунологической толерантности. В этой связи нельзя не упомянуть о регуляторных Т-лимфоцитах (CD4+CD25+ Т-лимфоциты), играющих не последнюю роль в поддержании периферической толерантности и модулирующих предрасположенность к аутоиммунным болезням.

Было показано, что пересадка регуляторных Т-клеток эффективно предотвращает реакцию отторжения трансплантата. Известно также, что после проведения ТКСК число этих клеток вырастает, что подтверждает восстанавливающее влияние ТКСК на иммунорегуляторные механизмы (есть мнение, что регуляторные Т-клетки более устойчивы к иммуноабляции, чем собственно иммунные Т-лимфоциты). Так, например, на мышиной модели рассеянного склероза было продемонстрировано, что после трансплантации костного мозга количество CD4+CD25+ Т-лимфоцитов возросло, а количество аутоантител резко уменьшилось.

Другими клетками, оказывающими выраженное иммуномодулирующее действие, являются мезенхимальные стволовые клетки (МСК). Свойства этих клеток и возможность их применения при лечении аутоиммунной патологии активно изучаются.

**Мезенхимальные стволовые клетки**

Сразу заметим, что термин «мезенхимальная стволовая клетка» применяющийся обычно для обозначения различных стромальных клеток-предшественников, иммуномодуляторные свойства которых столь активно изучаются. Истинная мезенхимальная стволовая клетка существует на самом деле, но речь пойдет не о ней, а о клетках-предшественниках, не являющихся в строгом смысле стволовыми.

Важнейшее свойство истинной стволовой клетки таково, что она при делении образует две дочерние клетки, одна из которых также является стволовой, а вторая начинает дифференцироваться.

Примером такой клетки является костномозговая стволовая клетка. В данном случае речь пойдет о клетках, которых более корректно было бы назвать «мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками», оставим за ними более привычное название и аббревиатуру МСК.

 Каковы основные свойства МСК, позволяющие отличать их от других типов клеток? Это клетки, адгезирующие к субстрату, внешне напоминающие фибробласты, экспрессирующие на поверхности маркеры CD73, CD90 и CD105, и не экспрессирующие маркеры кроветворных клеток CD14, CD34 и CD45.

Все МСК обладают способностью дифференцироваться по трем основным направлениям: остеогенному, адипогенному и хондрогенному. Первоначально МСК были найдены и описаны в строме костного мозга, однако позже выяснилось, что они присутствуют и в других тканях: периостальной и синовиальной оболочках, в синовиальной жидкости, в мышцах, в печени и крови, а также в жировой ткани.

Наиболее интересным с точки зрения практической медицины свойством МСК является их выраженная иммуномодулирующая активность. На мышах было показано, что МСК подавляют размножение стимулированных Т-клеток, предотвращая вход в S-фазу клеточного цикла, а также необратимо блокируя переход из G0 в G1-фазу. Впрочем, у приматов и людей, последний эффект оказался обратимым. Вместе с тем, МСК очень мало влияют, либо не влияют вовсе на эффекторную функцию или активацию Т-лимфоцтов. Ингибирование пролиферации Т-лимфоцитов, опосредованное МСК, действует «сквозь» HLA-барьеры (как при аллотрансплантации, так и при ксенотрансплантации) и проявляется как при первичном, так и при вторичном иммунном ответе. Имеются данные о том, что МСК подавляют также пролиферацию В-лимфоцитов и угнетают синтез антител активированными В-клетками.

 МСК препятствуют дифференцировке моноцитов в незрелые дендритные клетки, созреванию незрелых дендритных клеток, угнетают экспрессию дендритными клетками ко- стимуляторных молекул и цитокинов, что приводит к снижению способности последних активировать Т-лимфоциты.

 Сообщается о влиянии МСК на функции натуральных киллеров (снижение секреции интерферона γ, снижение пролиферации неактивных NK-клеток). МСК не только снижают иммунореактивность некоторых но и сами каким-то образом избегают иммунного отторжения. В экспериментах in vitro эти клетки не являются мишенями цитотоксических Т-клеток или натуральных киллеров.

Американским исследователям Trivedi и соавт. удалось получить CD73(+) МСК наряду с CD34(+) гемопоэтическими клетками из человеческих ЭСК при культивировании последних на фидерном слое мышиных стромальных клеток ОР9. В последствие исследователям удалось получить МСК, культивируя ЭСК в отсутствие фидерного слоя клеток на пластинах, покрытых Матригелем. При этом были получены клетки, напоминающие фибробласты, экспрессирующие характерные для МСК маркеры и способные к мультилинейной дифференцировке.

По своим характеристикам эти клетки оказались полностью аналогичными взрослым МСК из костного мозга человека. Подобно последним, экспрессировали только антигены MHC I класса, Кроме того, как и костномозговые МСК, проявляли иммуносупрессивные свойства, подавляя пролиферацию Т-лимфоцитов в тесте смешанной лейкоцитарной реакции (MLR-тест)

Иммуносупрессивный эффект МСК in vivo был впервые продемонстрирован на обезьянах, у которых инфузия размноженных донорских МСК достоверно отсрочила реакцию отторжения гистонесовместимого кожного трансплантата.

МСК были применены для лечения 9-летнего мальчика с тяжелой болезнью «трансплантат против хозяина», поразившей кишечник, кожу и печень после аллогенной ТКСК. Симптомы заболевания заметно уменьшились после трансплантации МСК, взятых от матери.

Было продемонстрировано иммуносупрессивное действие МСК на модели экспериментального аллергического энцефаломиелита, эффект от лечения проявлялся в наибольшей степени, если МСК пересаживали в начале заболевания. Противовоспалительные эффекты МСК были подтверждены на модели блеомицин-индуцированного фиброза легких у мышей: инъекция МСК способствовала уменьшению степени фиброза и воспаления.

Не удалось получить ожидаемого результата на модели артрита у мышей при системном или интрасуставном введении МСК. Отсутствие эффекта в последнем случае, возможно, было связано с высоким уровнем фактора некроза опухоли α в данной модели экспериментального артрита, а фактор этот, как стало известно, нивелирует иммуносупрессивные эффекты МСК.

Сейчас перед исследователями стоит задача исследовать более полно свойства МСК, определить оптимальный источник этих клеток, оптимальную «дозу» для трансплантации, найти способы эффективной очистки МСК от других клеточных популяций.

 Изучается также безопасность трансплантаций МСК. Несмотря на то, что аллогенные и ксеногенные пересадки МСК иммунокомпетентным мышам переносятся чаще всего хорошо без значимых побочных эффектов, все же известно, что МСК несут на себе небольшое количество антигенов HLA I класса, а, следовательно, повторные инфузии эти клеток могут вызвать реакцию отторжения.

Помимо этого, МСК культивируют в среде, содержащей сыворотку бычьей крови, имеются данные об образовании антител к белкам бычьей сыворотки у некоторых больных с несовершенным остеогенезом, леченых МСК. Эту проблему можно решить, заменив сыворотку животных на лизат человеческих тромбоцитов, что уже и происходит в некоторых лабораториях. Наконец, вызванная МСК иммуносупрессия может спровоцировать рост опухолей, что и было продемонстрировано на модели меланомы у мышей.