

Ministerul Sanatatii al Republicii Moldova.

Universitatea de Stat de Medicina si Farmacie „Nicolae Testemitanu”.

Facultatea- Medicina.

Catedra- Chirurgie Operatorie si Anatomie Topografică.

Laboratorul Inginerie tisulară și Culturi celulare.

## TEZA DE LICENTA

Tema: “ Celule stem a complexului ombilico-placentar în tratamentul  
maladiilor oculare.”

Autor: Focsa Stanislav

Student anul 6, gr.1643

Coordonator stiintific:

d.h.m.professor universitar Viorel NACU

CHISINAU 2014

## Содержание:

Введение. стр3

I. Плацента. Стволовые клетки пуповина- плацентарного комплекса. стр7

1.1. Термин "стволовая клетка" и история возникновения. стр 7

1.2. Виды стволовых клеток известные на сегодняшний день. стр 8

1.3.Современные изыскания в области изучения и использования в лечение  
стволовых клеток. стр14

1.4. Строение плаценты и других структур последа человека. стр19

1.5. Стволовые клетки и их источники. стр26

II. Стволовые клетки пуповина- плацентарного комплекса в терапии патологий  
глаза. стр47

Результаты исследования. Обсуждение. Выводы . стр 55

Библиография. стр 59

*“Я в этот мир пришел, чтоб видеть Солнце, и синий кругозор”*

(Константин Бальмонт)

## Введение.

Зрение из всех органов чувств является наиболее значимым для любого человека. С его помощью происходит восприятие всего окружающего мира и самого себя в нем. Примерно 2/3 всей информации мы получаем чрез наши зрительные анализаторы. Поэтому, заболевания глаз требуют такого пристального внимания, а над открытием новых способов их излечения работают целые научные институты.[1,2]

Учитывая сложное и сверхтонкое строение всей зрительной системы, не удивляет существование сотен офтальмологических заболеваний, которые поражают различные элементы человеческой глазной системы. К наиболее сложным относят болезни, затрагивающие сетчатку глаза. Новейшие методики позволяют излечивать её при помощи стволовых клеток человека. На сегодняшний день учёными доказана эффективность обширного применения стволовых клеток пуповина-плацентарного комплекса для лечения многих офтальмологических болезней. И список этих излечиваемых недугов только растёт. Также как и пуповинная кровь, плацента содержит огромное количество стволовых клеток. Стволовые клетки заслуженно носят звание «золота медицины», так как благодаря своим свойствам могут применяться для лечения множества болезней. Эти клетки успешно используют во всем мире для лечения онкологических заболеваний, сахарного диабета, цирроза печени, болезней костей и суставов, неврологических патологий, болезней сосудов, заболеваний глаз. Список показаний для применения клеточной терапии можно продолжать очень долго. Ученые даже имеют опыт выращивания из стволовых клеток органов и тканей. [ 1,2]

Среди самых опасных заболеваний в офтальмологии можно назвать дистрофию желтого пятна, глаукому, тапеторетинальную абнотрофию. Страшнее всего то, что при этих недугах разрушаются фоторецепторы и нейроны, расположенные в глазной сетчатой оболочке. Естественное восстановление данных структур без вмешательства невозможно, у больных людей зрение пропадает навсегда. [2]

Вот почему в таких ситуациях стволовые клетки плацентарного комплекса являются собой живительный источник. Они заново воссоздают деформированную сетчатку – это сенсационная, почти волшебная возможность, применимая уже и на практике. Вживленные в глаз стволовые клетки плацентарного комплекса сами перемещаются внутрь поврежденной зоны и спаиваются с пораженной тканью. Затем они дифференцируют в абсолютно здоровые клетки требуемого вида. В случае с травматическими повреждениями сетчатки глаз современными учеными применяются стволовые клетки пуповина-плацентарного комплекса с целью активизации естественных регенерирующих процессов в ней. Для придания большей эффективности лечению, при таких заболеваниях сетчатки, как астигматизм, тапеторетинальная дистрофия, атрофия зрительного нерва и тапеторетинальная дегенерация стволовые клетки пуповиной крови или плаценты внедряются непосредственно в глаз. Однако, к сожалению, такие болезни как глаукома и катаракта остаются неизлечимыми путем внедрения здоровых стволовых клеток. Само проведение процедуры пересадки стволовых клеток невероятно простое. При нем не требуется никакого хирургического вмешательства. Для фиксации трансплантата и как носитель клеток используется зачастую простая контактная линза.[10]

В большинстве стран существуют банки пуповинной крови, но лишь единицы предлагают сохранение плаценты. Несмотря на то, что плацента содержит во много раз большее количество стволовых клеток чем пуповинная кровь, процесс их выделения более сложный, трудоемкий и дорогостоящий. Для этого нужны специальные технологии и опытные специалисты. [2]

**Актуальность проблемы.** Последние десятилетия развития мировой медицинской науки характеризуются повышенным интересом к изучению биологии стволовых клеток и возможностями их использования в медицинской практике. Имеющиеся результаты таких исследований свидетельствуют о значительных возможностях для внедрения новых методов клеточной и тканевой терапии для лечения самых сложных болезней, при которых альтернативные лечебные мероприятия оказываются бессильными. [3]

Между тем, следует заметить, что многие вопросы, связанные с изучением механизмов терапевтического действия стволовых клеток пуповина-

плацентарного комплекса, возможности их доставки в поврежденную ткань, направленной дифференцировки стволовых клеток остаются в значительной мере неизученными. При старении организма развитие регенерации осуществляется на ином, отличном от молодого организма уровне, что может определять существенные различия в выраженности регенераторного ответа в ответ на действие экстремального фактора. В процессе старения развивается генерализованный G1/S - блок для процессов дифференцировки и пролиферации, нарушающий процессы клеточного самообновления. Одной из возможностей преодолеть такой блок является увеличение в организме количества клеток, способных к дифференцировке и пролиферации. С этой целью можно использовать стволовые клетки источником которых является пуповинная кровь и плацента. [3]

Лечение глазных болезней - это одна из тех областей, где очень эффективным является применение стволовых клеток. На сегодняшний день учёными доказана эффективность обширного применения стволовых клеток для лечения многих офтальмологических болезней. И список этих излечиваемых недугов только растёт.

Плацента и пуповина – это те побочные продукты родов, которые обычно выбрасываются. И только в последнее время ученые выяснили, что в них содержатся самые что ни на есть полезные компоненты – стволовые клетки ребенка. Если собрать их, сохранить, а потом правильно использовать, то они могут оказать неоценимую помощь в лечении многих заболеваний. [5]

Актуальность проблемы стволовых клеток не вызывает сомнений, ведь потенциал стволовых клеток только начинает использоваться наукой. Ученые надеются в ближайшем будущем создавать из них ткани и целые органы, необходимые больным для трансплантации взамен донорских органов. Их преимущество в том, что их можно вырастить из клеток самого пациента, и они не будут вызывать отторжения. Потребности медицины в таком материале практически неограниченны. [4,10]

Все вышеизложенное и явилось основанием для постановки основной цели и задач настоящего исследования:

### **Цели и задачи работы**

**Цель:** Изучение структуры пуповина- плацентарного комплекса и возможности использовать стволовые клетки комплекса для лечения заболеваний глаза

### **Задачи:**

1. Обзор литературы по указанной теме.
2. Исследование строение плаценты и ее составляющих.
3. Исследование пуповина-плацентарного комплекса как возможного источника стволовых клеток.
4. Исследование возможности использовать стволовые клетки пуповина-плацентарного комплекса для лечения заболеваний глаза.

## **I. Плацента. Стволовые клетки пуповина- плацентарного комплекса**

### **1.1 Термин "стволовая клетка" и история возникновения.**

Термин "стволовая клетка" был введен в биологию А. Максимовым в 1908 году на съезде гематологического общества в Берлине. Однако, родоначальником клеточной терапии общепринято считать русского врача-эмигранта С. Воронцова, который в 20-30-е годы в Париже пытался пересаживать фетальные ткани в случаях преждевременного старения. Несмотря на это, статус большой науки эта область клеточной биологии получила в последнее десятилетие XX века. Только в 1981 году американскому ученому Мартину Эвансу впервые удалось выделить недифференцированные плюрипотентные линии стволовых клеток из эмбриобласта (внутренней клеточной массы) бластоцисты мыши. В 1998 году Д. Томпсон и Д. Герхарт изолировали бессмертную линию эмбриональных стволовых клеток, а в 1999 году журнал Science признал открытие эмбриональных стволовых клеток третьим по значимости событием в биологии после расшифровки двойной спирали ДНК и программы "Геном человека". [10,11,12,14,17,20]

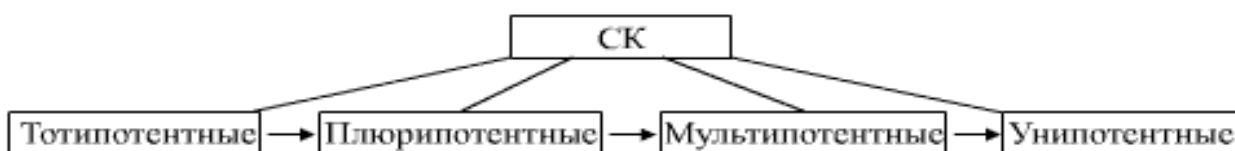
**Стволовые клетки** - это недифференцированные клетки, способные к пролиферации (делению), самоподдержанию и продукции большого числа дифференцированного, функционального потомства для регенерации тканей после повреждения. [10,18,13]

Самое главное свойство стволовой клетки состоит в том, что генетическая информация, заключенная в её ядре, находится как бы в "нулевой точке" отсчета. Дело в том, что все неполовые клетки живых организмов (соматические клетки) дифференцированы, то есть выполняют какие-либо специализированные функции: клетки костной ткани формируют скелет, кровяные - отвечают за иммунитет и разносят кислород, нервные - проводят электрический импульс. А стволовая клетка еще не "включила" механизмы, определяющие её специализацию. В "нулевой точке" её геном ещё не "запустил" ни одной программы и, что особенно важно, не начал выполнять программу размножения. [10,11,12,13,19]

## 1.2 Виды стволовых клеток известные на сегодняшний день:

Стволовые клетки человека можно классифицировать в соответствии с их дифференцировочным потенциалом.

- 1) Тотипотентные клетки способны формировать все эмбриональные и экстра-эмбриональные типы клеток. К ним относятся только оплодотворённый ооцит и бластомеры 2 – 8 клеточной стадии.
- 2) Плюрипотентные клетки способны формировать все типы клеток эмбриона. К ним относятся эмбриональные стволовые клетки, первичные половые клетки и клетки эмбриональных карцином.
- 3) Другие типы стволовых клеток локализуются в сформировавшихся тканях взрослого организма (adult stem cells) и называются взрослыми, регионарными или тканевыми стволовыми клетками. Они варьируют по способности к дифференцировке от мульти- до унипотентных. [9,8]



Однако в последние годы чаще используется классификация стволовых клеток по источникам их выделения: эмбриональные, фетальные (выделенные из абортивного материала) и стволовые клетки взрослого организма.



Рис 1. Изображены возможные источники стволовых клеток.



**1.Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК)** получают из так называемой внутренней клеточной массы раннего эмбриона на этапе бластоцисты (4-7 день развития). Это «идеальные» стволовые клетки, из которых в дальнейшем развивается весь организм. Все специализированные клетки организма по мере формирования эмбриона дифференцируются из неспециализированных эмбриональных стволовых клеток. [9] Эмбриональные стволовые клетки обладают рядом положительных и отрицательных характеристик, к которым относятся: Плюрипотентность - способность стволовой клетки дифференцироваться в несколько типов клеток различных тканей и органов (нервные клетки, красные кровяные тельца, клетки печени, клетки поджелудочной железы, кардиомиоциты, клетки эпидермиса, мышечные клетки и др.). Низкий уровень иммунореактивности – Эмбриональные стволовые клетки не несут на своих мембранах специфических молекул, которые могут быть опознаны иммунными клетками реципиента как чужеродные. По этой причине эмбриональные стволовые клетки практически никогда не отторгаются после трансплантации и не вызывают так называемой «реакции хозяин против трансплантата. [8] Этический аспект - Основным источником эмбриональных СК является абортивный материал или материал, оставшийся невостребованным после искусственного оплодотворения.[6,7,9] В случае ЭСК невозможно использовать аутологичный (собственный) материал.

**2. Фетальный клеточный материал** - клетки зародыша на 9-12 неделе развития. Наиболее веским обоснованием для использования фетального материала является возможность применения материала необходимого генеза. Вместе с тем возникают проблемы этического характера, а также множество вопросов относительно качества материала. Этический аспект – Материал, оставшийся в результате прерывания беременности, т.е. аборта. Невозможно использовать аутологичный материал.

ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЗАПРЕЩЕНЫ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МИНИСТЕРСТВАМИ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ.[7,8,9]

**3.Стволовые клетки взрослого организма:** В течение жизни во взрослом организме постоянно происходит гибель клеток различных тканей, как при естественном обновлении (апоптоз), так и при повреждениях (некроз). Восстановление утраченных клеток происходит за счет камбиальных элементов. В кишечнике, коже, мышцах, красном костном мозге, печени, головном мозге

существуют пролиферирующие тканеспецифические популяции клеток. В последние годы в тканях сформировавшегося организма были выявлены клеточные элементы, способные к дифференцировке не только в тканеспецифических направлениях, но и в клетки иного тканевого происхождения. При этом происходит потеря первичных тканевых маркеров и функций и приобретение маркеров и функций вновь образованного клеточного типа. Это явление получило название трансдифференцировки или пластичности. Подобные клеточные элементы классифицируют как мультипотентные стволовые клетки взрослого организма. Ещё одно их свойство – способность к миграции в другие ткани *in vivo*. К настоящему моменту выделены следующие типы стволовых клеток взрослого организма: гемопоэтические, мышечные, нервной ткани, кожи, эндотелия, кишечника, миокарда, гемопоэтические и мезенхимные стволовые клетки.[8,9]

**Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК)** Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) - популяция мультипотентных стволовых клеток - в настоящее время охарактеризована наиболее полно. ГСК находятся в красном костном мозге взрослого организма. Впервые популяция ГСК была выделена из костного мозга (КМ) мыши около 30 лет назад. Клоногенные свойства этих клеток, доказанные позднее в экспериментах *in vivo* и *in vitro*, позволили выделять данные клетки с высоким уровнем чистоты (~85 %-95 %). Фенотипическим "портретом" чистых популяций ГСК считается присутствие на поверхности клетки маркеров CD34, CD133, c-kit (CD117), и отсутствие CD38, и специфических маркеров коммитированных клеток крови: гликофорина А, CD2, CD3, CD4, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD56 и CD66b (Lin-). Долгое время считалось, что ГСК способны дифференцироваться только в клетки крови. Однако исследования по выявлению мультипотентности ГСК, выполненные в последние годы, показали, что при трансплантации в кровотоки ГСК могут дифференцироваться также в гепатоциты, клетки эпителия и эндотелий. [9] На основании экспериментальных работ, выполненных в течение последних лет, ГСК можно считать агентами клеточной терапии только при повреждениях печени и сосудов. Несмотря на разработанные протоколы выделения чистых популяций ГСК из взрослого организма, нет методик их культивирования *in vitro* (в лабораторных условиях). Существующие методы позволяют лишь сохранить или незначительно обогатить популяцию

гемопозитических стволовых клеток. Уже первые попытки их культивирования показали необходимость присутствия фидерного слоя из клеток стромы костного мозга. Как выяснилось позднее, именно клетки стромы костного мозга являются ключевыми регуляторами популяции ГСК. Стромальные элементы определяют пролиферацию и дифференцировку ГСК в костном мозге. Следует отметить, что стромальные клеточные элементы выделяют факторы, определяющие дифференцировку ГСК и миграцию ГСК в костный мозг. [7,8] [9] ГСК способны мигрировать не только в костный мозг, но и из костного мозга в кровотоки. Показано, что выход ГСК из костного мозга происходит в ответ на воздействие факторов мобилизации: гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ). Эти факторы также выделяются клетками стромы. Воздействие ГМ-КСФ и Г-КСФ увеличивает количество ГСК в периферической крови на порядок. [8,9] ГСК могут являться инструментом клеточной терапии при некоторых заболеваниях. Современный уровень развития биотехнологии позволяет исследователям использовать аутологичные ГСК, выделяя их из периферической крови в достаточном количестве. Однако механизмы трансдифференцировки ГСК в настоящий момент изучены недостаточно.

До последнего времени костный мозг являлся единственным источником гемопозитических стволовых клеток. После некоторых медицинских процедур и введения в организм так называемых факторов мобилизации (Г-КСФ и ГМ-КСФ) в периферической крови можно увеличить количество ГСК. Нехватка образцов костного мозга заставила исследователей обратить внимание на альтернативные источники стволовых клеток крови. Несомненно, одним из них является пуповинная/плацентарная кровь. В последние годы исследования применимости пуповинной крови шагнули далеко вперед и многие врачи сошлись во мнении, что трансплантация стволовых клеток пуповинной крови может быть альтернативой пересадки костного мозга при онкогематологических и гематологических заболеваниях. Итак, ГСК мультипотентны, могут дифференцироваться в клетки различных органов. При работе с ГСК можно использовать аутологичный материал, и как следствие нет риска отторжения при трансплантации реципиента. Они подвергаются криоконсервации, иными словами существует возможность хранения собственных клеток «про запас» с возможностью их использования через

длительное время при сохранении всех свойств и возраста клеток на момент забора. Они не дают опухолей *in vivo*, при введении в организм не вызывают роста новообразований. На сегодняшний день их нельзя культивировать *ex vivo*, на настоящий момент не выработаны стабильно воспроизводимые методики увеличения количества гемопоэтических клеток в лабораторных условиях. [7,8,9]

**Стволовые клетки нервной ткани (НСК)** расположены в специфических областях мозга человека и других млекопитающих. Источником стволовых клеток нервной ткани является головной мозг как сформировавшегося, так и развивающегося организма. В результате проведенных экспериментов по трансплантации НСК клетки с донорской меткой были обнаружены в сердце, печени, центральной нервной системе, кишечнике и легких, что доказывает их мультипотентность. Несмотря на то, что НСК являются мультипотентными и существует возможность их культивирования *in vivo*, их применение влечет за собой массу сложностей. Выделение стволовых клеток нервной ткани связано с полным разрушением головного мозга, что делает невозможным применение аутологичного материала, а, как следствие этого, появляются те же проблемы этического и иммунологического характера, что и при использовании фетальных клеток. Для клеточной терапии НСК наиболее перспективны при использовании их ортодоксального дифференцировочного потенциала (нейроны и глия). К настоящему моменту разработаны коктейли химических индукторов коммитации НСК к дифференцировке в одном направлении (Bithell and Williams 2005). НСК локализованы в субэпендимном клеточном слое 3 и 4 желудочков головного мозга (Romanenko et al., 2004). Таким образом, выделение НСК связано с разрушением головного мозга донора (Rietze et al., 2001). Но при этом возможно использование аллогенного материала для клеточной терапии ЦНС в связи с наличием гематоэнцефалического барьера и отсутствием иммунологических реакций на чужеродный материал, введенный в ЦНС реципиента. Эксперименты с применением фетального материала при терапии болезни Паркинсона к настоящему моменту уже проведены как на экспериментальных животных, так и в клинике (Burnstein et al., 2004). [6,7,8,9]

**Стволовые клетки кожи** выделяют из покровных тканей как эмбриона, так и взрослого организма. Клеточную терапию стволовыми клетками кожи связывают прежде всего с восстановлением кожных покровов, например, с

восстановлением кожи после обширных ожогов. Сегодня подобные разработки уже применяют в клинике. [6,7,8,9]

**Стволовые клетки скелетной мускулатуры** выделяют из поперечнополосатой мускулатуры. Эти клетки способны к дифференцировке в клетки нервной, хрящевой, жировой и костной тканей, а также, естественно, в клетки поперечнополосатой мускулатуры. Однако последние исследования показывают, что клетки скелетной мускулатуры являются не чем иным, как отдельной популяцией мезенхимных стволовых клеток. [6,7,8,9]

**Стволовые клетки миокарда.** В 90-х гг. XX века из миокарда новорожденных крыс были выделены клеточные элементы, способные к дифференцировке в кардиомиоциты и эндотелий сосудов. Трансплантация таких клеток в область инфаркта миокарда приводит к развитию в зоне повреждения новых кардиомиоцитов и сосудов, в результате чего восстанавливаются функции органа. Однако методика выделения данных клеточных элементов очень сложна и связана с полным разрушением мышечной ткани сердца. [6,7,8,9]

**Мезенхимные стволовые клетки (МСК)** Традиционным источником МСК является строма костного мозга. В результате проведенных исследований мезенхимные стволовые клетки были обнаружены также в подкожной жировой ткани, которая в больших количествах остается после пластических операций. В настоящее время ведется множество научно-исследовательских работ по выделению достаточного количества МСК из костной ткани и пуповинной крови. Мезенхимные **стволовые клетки** человека рассматривают как один из основных элементов клеточной терапии. Действительно, МСК плюрипотентны и могут дифференцироваться в клетки костной, жировой, мышечной, хрящевой, нервной и прочих тканей. Неоспоримым достоинством работы с МСК служит то, что существует возможность применения аутологичного материала. [6,7,8,9]

## Основные свойства стволовых клеток

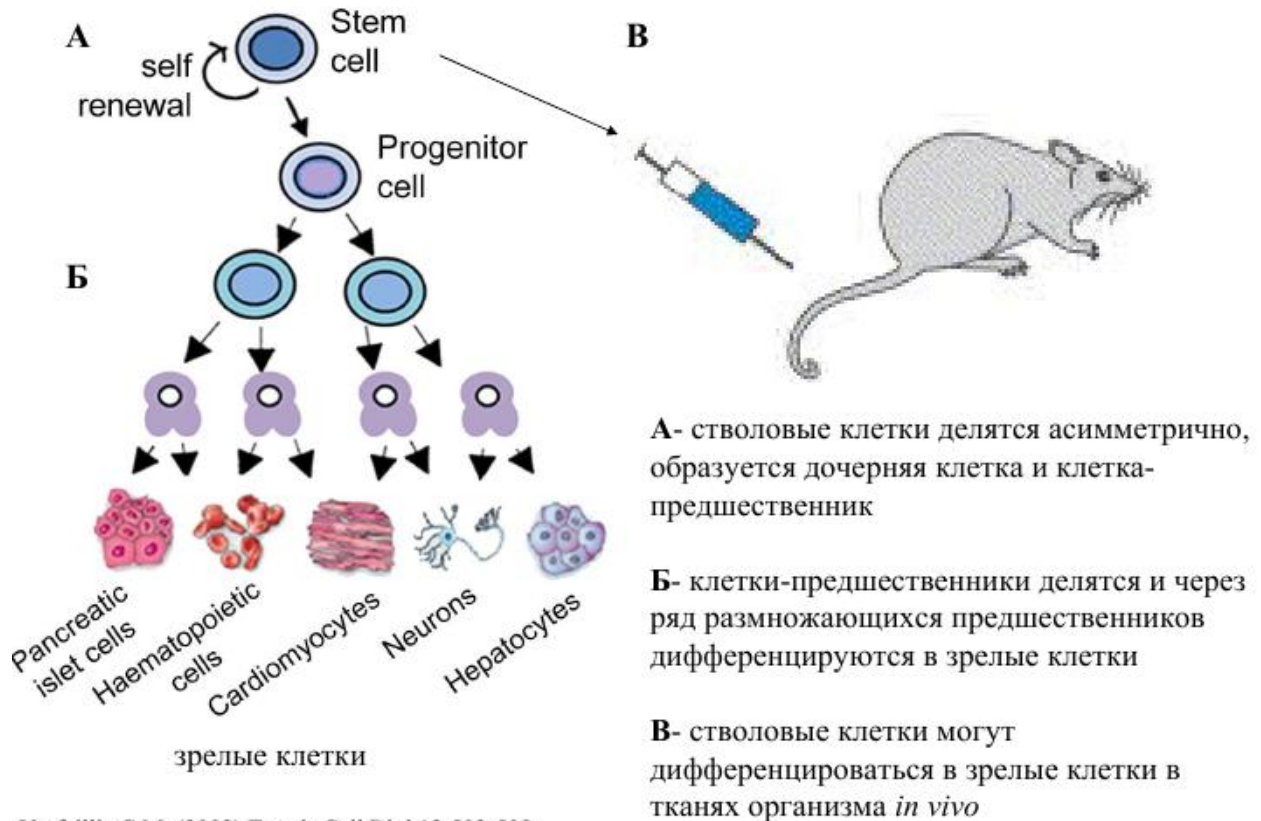


Рис 2. Основные свойства стволовых клеток.

### 1.3 Современные изыскания в области изучения и использования в лечение стволовых клеток.

Первые эксперименты по практическому использованию стволовых клеток были начаты еще в начале 1950-х годов. Именно тогда было доказано, что с помощью трансплантации костного мозга (основного источника стволовых клеток) можно спасти животных, получивших смертельную дозу радиоактивного облучения. Понадобилось почти 20 лет, чтобы трансплантация костного мозга вошла в арсенал практической медицины. Только в конце 60-х были получены убедительные данные о возможности применения трансплантации костного мозга при лечении острых лейкозов. Начиная с этого времени, началась новая эра в медицине. Вот только некоторые ее вехи: 1970-е. Первые трансплантации аутологичных (своих собственных) стволовых клеток. 1988. Первая в мире успешная трансплантация пуповинной крови пациенту с

анемией Фанкони. 1992. Первая именная коллекция стволовых клеток – профессор Дэвид Харрис "на всякий случай" заморозил стволовые клетки пуповинной крови своего первенца. Сегодня, Д. Харрис – директор крупнейшего в мире банка стволовых клеток пуповинной крови. 1997. За предшествующие 10 лет в 45 медицинских центрах мира проведено 143 трансплантации пуповинной крови. 1998. Первая в мире трансплантация "именных" стволовых клеток пуповинной крови девочке с нейробластомой (опухоль мозга). Биологическая страховка сработала – ребенок спасен. 1998. Общее число проведенных трансплантаций пуповинной крови превышает 600. 2000. В мире проведено 1200 трансплантаций стволовых клеток пуповинной крови, из них – 200 родственных. 2001. Опубликованы первые официальные данные о возможности применения трансплантации стволовых клеток пуповинной крови у взрослых пациентов. Из них более 90% - успешные. 2002. Стволовые клетки пуповинной крови новорожденного были безвозмездно переданы родителями в банк-регистр (банк безымянных образцов). Когда через несколько лет они понадобились (ребенок заболел), выяснилось, что банк, не несущий перед родителями никаких обязательств, уже использовал клетки для научных исследований. Для обеспечения необходимого донора пришлось беременеть и рожать еще одного ребенка. 2003. Журнал Национальной Академии Наук США (PNAS USA) опубликовал сообщение о том, что через 15 лет хранения в жидком азоте стволовые клетки пуповинной крови полностью сохраняют свои биологические свойства. С этого момента криогенное хранение стволовых клеток стало рассматриваться, как "биологическая страховка". 2004. Общая мировая коллекция стволовых клеток пуповинной крови приближается к 400000 образцов. В мире произведено около 5000 трансплантаций пуповинной крови. Для сравнения, число трансплантаций костного мозга за тот же период составило около 85000. 2005. Перечень заболеваний, при лечении которых может быть успешно применена трансплантация стволовых клеток, достигает нескольких десятков. Естественно, что основное внимание, по-прежнему, уделяется возможности лечения злокачественных новообразований и, прежде всего, различных форм лейкозов и других болезней крови. Однако все чаще появляются сообщения об успешной трансплантации стволовых клеток при заболеваниях сердечно-сосудистой и нервной систем. Разработаны международные протоколы лечения рассеянного склероза. Проводятся многоцентровые исследования при лечении инфаркта миокарда и сердечной

недостаточности. Ищутся подходы к лечению инсульта, болезни Паркинсона и Альцгеймера. Но пройдут еще годы, а может десятилетия, прежде чем стволовые клетки займут достойное место в арсенале средств современной медицины. [10,11,12,13,14,18,19,20]

Публикация в журнале *Haematologica*, 2009г, где говорится о том, что начиная с 1988 года, трансплантация (пересадка) клеток пуповинной крови прочно вошла в арсенал средств практической медицины. Этот, как теперь принято говорить, «альтернативный» источник не только не уступает костному мозгу (традиционному источнику клеток для трансплантации), но и превосходит его по целому ряду параметров.

Если число трансплантаций костного мозга на протяжении последних лет меняется незначительно, то доля трансплантаций клеток пуповинной крови неуклонно растет из года в год. Для сравнения, к 2006 году их было выполнено около 8 тысяч, в 2008 и 2010 – 12 и 24 тысячи, соответственно. Число трансплантаций, проведенных в мире на рубеже 2011-2012 гг., оценивается примерно в 30 тысяч по данным *Cordbloodbank*. В Японии каждая вторая трансплантация выполняется с использованием клеток пуповинной крови.

Современные подходы к идентификации и изучению гемопоэтических стволовых клеток основаны на анализе их потенциала *in vitro* (способности формировать различные ростки кроветворения) в сочетании с проточной цитофлуориметрией, позволяющей охарактеризовать их фенотип (определенный набор клеточных белков-маркеров). Основным маркером гемопоэтических стволовых клеток является CD34 – белок. Подобный фенотип характеризует гемопоэтические стволовые клетки вне зависимости от их источника: костного мозга, периферической или пуповинной крови.

Крупнейшие банки персонального хранения пуповинной крови США и Европы сообщают о сотнях тысяч «именных» образцов клеток, сохраненных для семейного использования:

*Cord Blood Registry* – более 400 тысяч; *ViaCord* – более 250 тысяч; *Cryo-Cell International* – около 240 тысяч; *Cryo-Save* – более 200 тысяч. Общая мировая коллекция «именных» образцов оценивается примерно в 1.500.000



Известно, что плаценту применял известный врач древности Авиценна и отец медицины Гиппократ (V век до н.э.). Однако, биохимический состав и лечебные свойства плаценты с научной точки зрения впервые описал известный российский офтальмолог В.П. Филатов только в начале прошлого века. И, как сказал современный индийский ученый P. D. Chakraborty, посвятивший множество своих исследований плацентарным препаратам: «Плацента – это уникальная сокровищница, в которой содержатся практически все биологически активные вещества, синтезируемые в организме человека». В апреле 2001 г. было опубликовано сообщение, что американская фирма Anthrogenesis Corporation (AnthroGen) получила из человеческой плаценты значительное количество (в 10 раз больше, чем из пуповинной крови) стволовых клеток, способных преобразовываться в кожные, кровяные, мышечные и нервные клетки. Плацента становится одним из наиболее перспективных источников стволовых клеток как для ауто-, так и для аллотрансплантации. Можно будет создать криобанк плацентарных стволовых клеток, содержащий клетки со множеством различных комбинаций антигенов.

Сентябрь 2009г Доктор Роберт Харири, президент LifebankUSA и Celgene Cellular Therapeutics сказал следующее: "... плацента является важным и новым источником стволовых клеток, которые потенциально могут быть использованы для восстановления поврежденных органов человека".

Celgene Corporation - известная биофармацевтическая компания на Международной конференции по исследованию стволовых клеток и применению их в терапии (Сан-Диего) объявила, что в плаценте человека имеются стволовые клетки, имеющие признаки "плюрипотентности", то есть возможности дать начало различным типам тканей.

30 марта 2011 года, Глава компании Зами Аберман отмечает, что одной плаценты хватит на лечение 10 тыс. человек. Впереди у его фирмы доклинические испытания в Нью-Йоркском университете (США), которые покажут, действительно ли таким образом можно избавить пациента от язв диабетической стопы, которые поражают 10% диабетиков и зачастую кончаются ампутацией. По идее, стволовые клетки должны привести к росту новых кровеносных сосудов и восстановлению тканей. В основе арсенала

Pluristem Therapeutics — запатентованная клеточная линия PLacental eXpanded (PLX).

В 2012г Специалисты медицинской компании Advanced Cell Technology, проводившие процедуру, рассказали в интервью журналу The Lancet, что впервые в истории медицины двум полностью слепым пациентам были успешно имплантированы стволовые клетки сетчатки глаза, позволившие вернуть им зрение.

2013г министр здравоохранения Японии Норихиса Тамура одобрил заявку исследовательской группы при институте RIKEN в городе Кобэ на использование с целью клинических испытаний индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPS) для восстановления зрения у людей с серьезными заболеваниями глаз, сообщает телекомпания NHK.

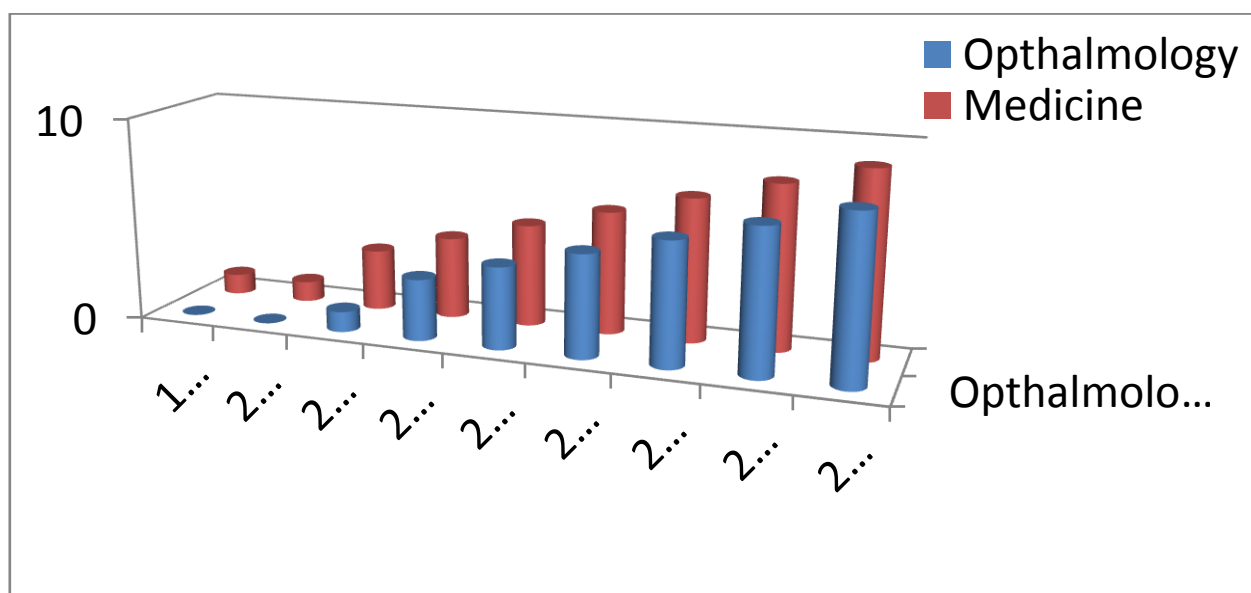


Диаграмма 1. Рост использования стволовых клеток пуповина – плацентарного комплекса в лечение заболеваний глаза и других заболеваний.

#### **1.4.Строение плаценты и других структур последа человека.**

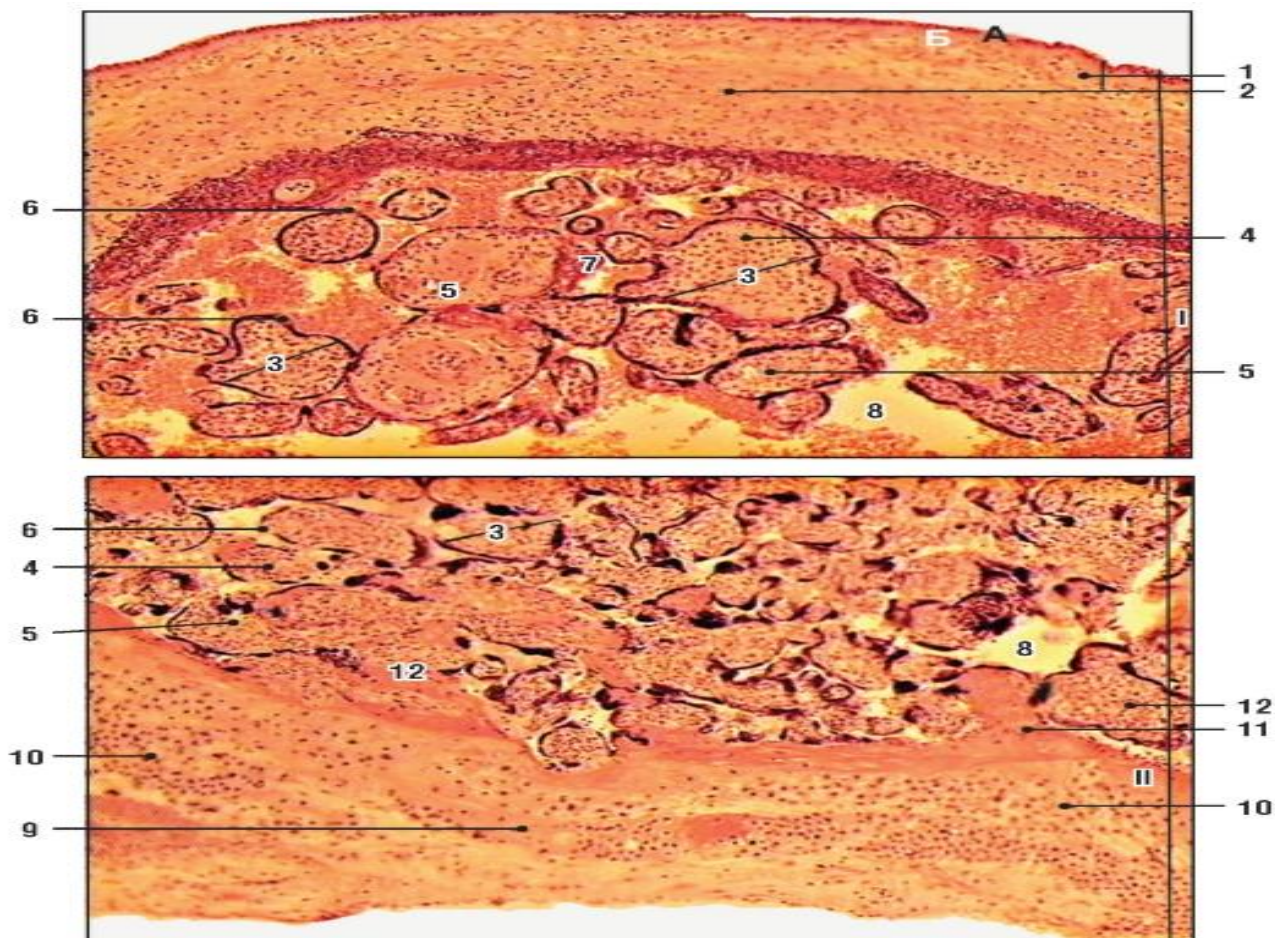
Прежде чем перейти к описанию строения плаценты мы должны дать определение понятию «послед». Он включает в себя плаценту, пупочный канатик и плодные оболочки. [21,22,26]

Плодные оболочки складываются из амниона (со стороны плода), гладкого хориона и децидуальной оболочки (формируется из слившихся париетальной и капсулярной). Понятие о последе важно с клинической точки зрения, так как объектом изучения является не только плацента, но и остальные структуры. [21,25,26,29]

В целом в структуре плодных оболочек можно выделить 7 слоев (порядок указан со стороны амниотической полости):

- 1)амниотический эпителий с базальной мембраной;
- 2)строма амниотической оболочки;
- 3)губчатый (спонгиозный слой);
- 4)ткань гладкого хориона;
- 5)трофобласт (вневорсинчатый);
- 6)слой фибриноида;
- 7)децидуальная ткань.

Плацента состоит из двух частей: плодной и материнской.



**Рис 3. Плацента человека (окраска гематоксилином и эозином, малое увеличение):** I - плодная (детская) часть плаценты; II - материнская часть плаценты; 1 - амниотическая оболочка; А - амниотический эпителий; Б - соединительная ткань амниона; 2 - хориальная пластинка; 3 - срезы терминальных ворсинок; 4 - соединительнотканная строма ворсинки; 5 - сосуды плода; 6 - синцитиотрофобласт (симпласто-трофобласт); 7 - фибриноид Лангханса; 8 - лакуны с материнской кровью; 9 - базальная пластинка; 10 - децидуальные клетки; 11 - соединительнотканнные септы; 12 - якорная ворсинка

**Плодная часть плаценты.** Описание структуры плаценты начнем с момента завершения плацентации, примерно с конца 12 недели, когда уже сформированы ее основные структуры и структурно-функциональные единицы- котиледоны. Плодная часть плаценты, как уже описано, развивается из трофобласта имплантационного полюса бластоцисты и внезародышевой мезенхимы. Эта область уже с раннего периода эмбриогенеза находится в тесном контакте с формирующимся амнионом,

который замыкает внеэмбриональную целомическую полость. Увеличение объема амниотической полости приводит к слиянию наружных соединительнотканых слоев амниотической оболочки с внутренним соединительнотканым слоем хориона и формируется так называемая амниохориальная мембрана. Поэтому плодная поверхность плаценты покрыта амниотической оболочкой, которая покрывает хориальную пластинку, а эпителий ее продолжается в покров пупочного канатика, переходя в области пупочного кольца в кожные покровы плода. Мы рассмотрим также строение амниона, учитывая его тесную связь с хорионом, в частности, хориальной пластинкой плаценты. Структуры, составляющие плодную часть плаценты со стороны амниотической полости, расположены в следующей последовательности.[21,22,23,28,29,32]

1. Амниотический эпителий (АМН). Большинство его клеток имеют призматическую форму, апикально расположенные ядра. Цитоплазма эпителиоцитов насыщена липидами, а в ранние сроки - гликогеном. Апикальная часть клеток снабжена щеточной каемкой, обращенной в полость амниона. С 3-го месяца беременности эпителий уплощается, становится вначале кубическим, а затем плоским. В нем увеличивается число многоядерных клеток.[21,22,23]

2. Базальная мембрана амниотического эпителия, построенная из сети ретикулярных волокон.

3. Соединительнотканые слои амниона, среди которых последовательно со стороны базальной мембраны выделяются компактный слой (плотная сеть ретикулярных волокон), слой фибробластов (насыщенный клеточными элементами среди сети коллагеновых, ретикулярных волокон и основного вещества) и губчатый (спонгиозный) слой, волокна которого продолжаются в соединительную ткань хориона. В связи с рыхлой структурой этого слоя на гистологических препаратах амниотическая оболочка может полностью отслаиваться, особенно при отеке, и образуется "амнио-хориальное пространство" (АХП).[21,24,27]

Далее расположены элементы собственно хориона.

4.Хориальная пластика (ХП), образованная волокнистой соединительной тканью, насыщенной коллагеновыми волокнами, фиброцитами. В толще хориальной пластинки, являющейся основанием для ворсинчатого дерева плаценты, расположены крупные ветви пупочных артерий и притоки пупочной вены.[21,22,23]

5.Фибриноид Лангганса (ФЛ), покрывающий поверхность хориальной пластинки со стороны межворсинчатого пространства.

Образование фибриноида, являющегося результатом коагуляционного некроза тканей эндометрия с выпадением фибрина из материнской крови межворсинчатых пространств, происходит с момента имплантации. Он имеется и в других частях плаценты. Допускается участие в формировании компонентов фибриноида синтетической активности синцитиотрофобласта. По химическому составу он является кислым гликопротеином, содержащим остатки сиаловой кислоты. Гистологически фибриноид выглядит как однородная, выражено оксифильная масса, в которую могут быть включены элементы периферического трофобласта. Он дает положительную PAS-реакцию, пиронинофилен, импрегнируется серебром. В его структуре на обычных препаратах можно выделить 2 слоя – компактный (непосредственно на хориальной пластине) и сетчатый (со стороны лакун плаценты). Функциональная роль фибриноида двоякая. С одной стороны, он сдерживает инвазивный рост трофобласта. С другой, является одним из компонентов плацентарного барьера. [21,27,28,29,30,32]

6.Ворсины сформированной плаценты. Они подразделяются в порядке их ветвления, по структуре и функциональной характеристике. От хориальной пластины отходят стволые ворсины (СВ), в которых располагаются крупные ветви пупочных сосудов. Немногочисленные капилляры занимают периферическое положение, непосредственно под трофобластом (парасосудистая сеть). Диаметр стволых ворсин в период плацентации варьирует от 200 до 2000 мкм. От них отходят промежуточные ветви (ПВ) диаметром 80-200 мкм, заканчивающиеся терминальными (концевыми) ворсинами (ТВ). Сосудистое русло терминальных ворсин к концу периода плацентации представлено центрально расположенной сетью из 4-5 узких

капилляров. Периферические части ворсинчатого дерева плаценты, непосредственно контактирующие с базальной децидуальной оболочкой и прикрепляющиеся к ней, формируют якорные ворсины. Кроме этого, соседние ворсины соединяются поперечными тяжами трофобластического эпителия, придающими межворсинчатым пространствам сложное многокамерное строение.[21,22,23,24]

**Материнская часть плаценты.** Материнская часть плаценты образована базальной пластинкой эндометрия (базальной децидуальной оболочкой), от которой в межворсинчатые пространства отходят соединительнотканые перегородки (септы). Периферические участки септ не достигают внутренней поверхности хориальной пластинки, в связи с чем и формируется субхориальное озеро. [21,22,23,32] Внутренняя (со стороны межворсинчатых пространств) поверхность базальной пластинки также, как и хориальная пластинка покрыта слоем фибриноида. Фибриноид, отделяющий дно межворсинчатых пространств от материнской крови, называется фибриноидом Рор(а) (ФР), а разграничивающий якорные ворсины и базальную пластинку - фибриноидом Ниттабух (ФН). В толще базальной пластинки располагаются спиральные сегменты артерий эндометрия, стенки которых подвергаются фибриноидному некрозу под действием гидролитических ферментов трофобласта. В связи с этим их просвет постоянно зияет, что обеспечивает стабильный и интенсивный кровоток в межворсинчатых пространствах. К концу нормальной беременности насчитывается около 100-120 открытых устьев спиральных (маточно-плацентарных) артерий с их преимущественной концентрацией в центре плацентарного диска. В то же время, венозные сосуды (маточно-плацентарные вены), которые обеспечивают отток крови из закрытых хориальной пластинкой межворсинчатых пространств, концентрируются преимущественно на периферии плацентарного диска. Их количество несколько больше, чем артерий - около 200. [21,22,23] Таким образом, кровь из маточно-плацентарных (измененных спиральных) артерий в виде фонтана (лучей Борелля) омывает ворсины хориона, течет преимущественно от центра плаценты к ее периферии по субхориальному озеру и оттекает в маточно-плацентарные вены. Кроме этого, септы, разделяющие межворсинчатые пространства, имеют каналы для укороченного пути



кровеносного . После рождения плаценты эндометрий в области имплантации оказывается разорванным на 2 части. Та часть, которая остается в полости матки называется плацентарным ложем матки (ПЛ). В его состав помимо тканей децидуальной оболочки, содержащей эндометриальные сосуды, пучки миоцитов миометрия, входят фрагменты якорных ворсин, вневорсинчатый (интерстициальный и внутрисосудистый) цитотрофобласт, многоядерные гигантские клетки. [21,22,23,27,28,29,32]

**Строение пупочного канатика.** Пупочный канатик является структурой, соединяющей сосудистую систему эмбриона, а затем плода и сосуды плаценты.[33] Внешне пупочный канатик представляет собой спиралевидный тяж желеобразной консистенции, с гладкой поверхностью, в полупрозрачной толще которого просматриваются кровеносные сосуды.



**Рис 4. Пупочный канатик (поперечный срез, окраска гематоксилином и эозином):** 1 - амниотическая оболочка с амниотическим эпителием; 2 - слизистая ткань (вартонов студень); 3 - пупочная артерия; 4 - пупочная вена; 5 - остаток аллантаоиса; 6 - остатки желточного мешка

Микроскопическая структура включает в себя следующие компоненты: 1)покрывающий эпителий, который продолжается с амниотической оболочки до пупочного кольца, где переходит в эпителий кожи плода; 2)строму, богатую гиалуроновой кислотой, что обуславливает ее высокую гидрофильность и желеобразную консистенцию (вартонов студень), содержащую помимо основного вещества веретеновидные фибробластические клетки; 3)кровеносные сосуды – 2 артерии и 1 вену. Остаток желточного протока и аллантаоиса, в реальном материале пуповин человека, исследуемых после родов, отсутствуют,



так как содержатся только в непосредственной близости пупочному кольцу, а значит в той части, которая остается у новорожденного в культе пупочного канатика и не попадает в послеродовой материал.[33,32,31] Оптимальным является вариант тесного, в виде «кучки» расположения сосудов, когда вена оказывается окруженной двумя артериями. Структура стенки пупочных сосудов также отличается своеобразием, что связано с необходимостью обеспечения постоянного кровотока. Не случайно, что в пупочном канатике так и не найдены нервные элементы, которые могли бы повлиять на кровоток (вызвать спазм сосудов) при различных стрессовых ситуациях. Как артерии, так и вены содержат развитые слои гладких миоцитов, имеющие большую толщину в артериях. [21,22,23] Кроме этого, в артериях хорошо развит эластический каркас. В стенке артерий миоциты расположены в 2 слоя: широкий внутренний продольный (ВС) и наружный циркулярный (НС). В вене гладкие миоциты расположены спиралевидно и отличаются меньшей компактностью, в связи с чем стенка вены проницаема для веществ, содержащихся в кровотоке. Эндотелиальные клетки в артериях и венах тесно контактируют с внутренними слоями гладких миоцитов, что при световой микроскопии отражает их расположение в виде частокола. [21,33] В наружных слоях стромы пуповины содержатся неправильной формы щелевидные полости (стромальные каналы), которые выполняют транспортную функцию.

### 1.5. Стволовые клетки и их источники.

Сегодня о стволовых клетках слышали многие, в том числе далекие от науки люди. Однако далеко не все понимают, что такое стволовые клетки, откуда берутся и где "обитают" стволовые клетки.[35,36]

Таблица 1. Источники взрослых человеческих стволовых клеток.

<b>Источник</b>	<b>Примечания</b>
Молочные зубы	Постнатальные клетки из выпадающих молочных зубов могут работать по-другому, чем взрослые стволовые клетки
Кровь	Стволовые клетки периферической крови ведут себя как гемопоэтические стволовые клетки
Костный мозг	Гемопоэтические стволовые клетки могут превращаться в клетки различных других типов
Головной мозг	Нервные стволовые клетки могут превращаться в клетки различных других типов
Молочные железы	Клетки протоков, полученные при косметических операциях по уменьшению молочных желез, могут регенерировать целый проток
Пуповинная кровь	Различные типы стволовых клеток, включая гемопоэтические стволовые клетки
Жир	Стволовые клетки из полученного при липосакции материала могут превращаться в клетки различных других типов
Печень	Стволовые клетки печени – потенциальный источник гепатоцитов для лечения болезней печени
Поджелудочная железа	Клетки-предшественники, выстилающие протоки, могут дифференцироваться в эндокринную и экзокринную ткань
Кожа	Мультипотентные стволовые клетки становятся кератиноцитами эпидермиса, клетками сальных желез и

	волосяных фолликулов
Селезенка	Источник взрослых стволовых клеток, которые могут дать регенерацию островков поджелудочной железы

Стволовыми называют клетки, не имеющие "специализации" и способные делиться, превращаясь в любой вид ткани - скелетные мышцы, нейроны, кровь, ткань печени и так далее. Стволовые клетки играют роль универсальных "запасных частей", которые используются организмом для починки или восстановления разных тканей. Еще в 60-70-е годы советские ученые Александр Фриденштейн и Иосиф Чертков впервые обнаружили, что "центральным складом" стволовых клеток в нашем организме является костный мозг.[35,37,38] Проблема лишь в том, что с возрастом содержание стволовых клеток в костном мозге, а также способность организма их вырабатывать резко падают. Выход нашли во введении стволовых клеток извне. Но откуда же их взять. Наиболее изученным источником стволовых клеток является донорский костный мозг. Но донорского костного мозга не хватает даже для больных, страдающих заболеваниями крови.[38] Есть и другой источник стволовых клеток - эмбрион ранней стадии развития. Из материала, полученного во время аборт или в результате искусственного оплодотворения "в пробирке", можно получить эмбриональные стволовые клетки. Эмбриональные стволовые клетки значительно более универсальны, чем более "узкоспециализированные" стволовые клетки из взрослого организма. Однако вопрос применения эмбриональных стволовых клеток в медицине еще недостаточно хорошо изучен.[38,36] Не переродятся ли они в безудержно размножающиеся раковые клетки. Безопаснее использовать взрослые, или, как их называют, постнатальные (полученные после рождения) стволовые клетки. А получить их вполне реально, поскольку существует достаточно безопасный и дешевый источник. Это плацента и кровь пуповины новорожденных, которая очень "богата" стволовыми клетками.[36] Источник практически неиссякаемый. Кроме того, сбор пуповинной крови не вызывает ни этических, ни серьезных технологических проблем. Если создать банк образцов такой крови, то он сможет полностью заменить всю систему сбора костного мозга для пересадки! Стволовые клетки, полученные из пуповины и плаценты, практически

универсальны и могут быть использованы для лечения многих людей, страдающих, как уже говорилось, самыми разными недугами.[38,37]

## Современные критерии определения МСК

(требования комитета по мезенхимным и тканевым СК  
Международного общества клеточной терапии, 2006г)

1. Адгезия к пластику при стандартных условиях культивирования		
2. Фенотип	Положительная экспрессия (>95% +)	Отрицательная экспрессия (<2% +)
	<b>CD105</b> <b>CD73</b> <b>CD90</b>	CD45 CD34 CD14 или CD11b CD79a или CD19 HLA-DR
3. Дифференцировка <i>in vitro</i> : остеобласты, хондроциты, адипоциты		

Dominici et al., 2006

Рис 5. Современные критерии определения МСК. 2006г

# этапы работы с клеточным материалом

1. **Выделение**
2. **Сортировка**
3. **Культивирование**
  - микробиологический и токсикологический контроль
  - размножение
  - стимуляция дифференцировки
4. **Характеристика полученных культур**
5. **Криоконсервация**
6. **Трансплантация в поврежденную ткань**



Стратегия трансплантации аутологичных стволовых клеток

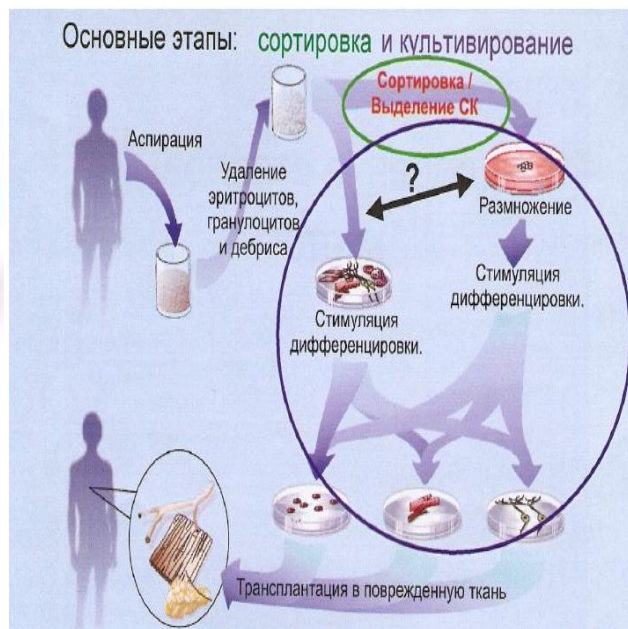


Рис 6. Расходные материалы и стратегия трансплантации СК.

## Источники экстраэмбриональных стволовых клеток

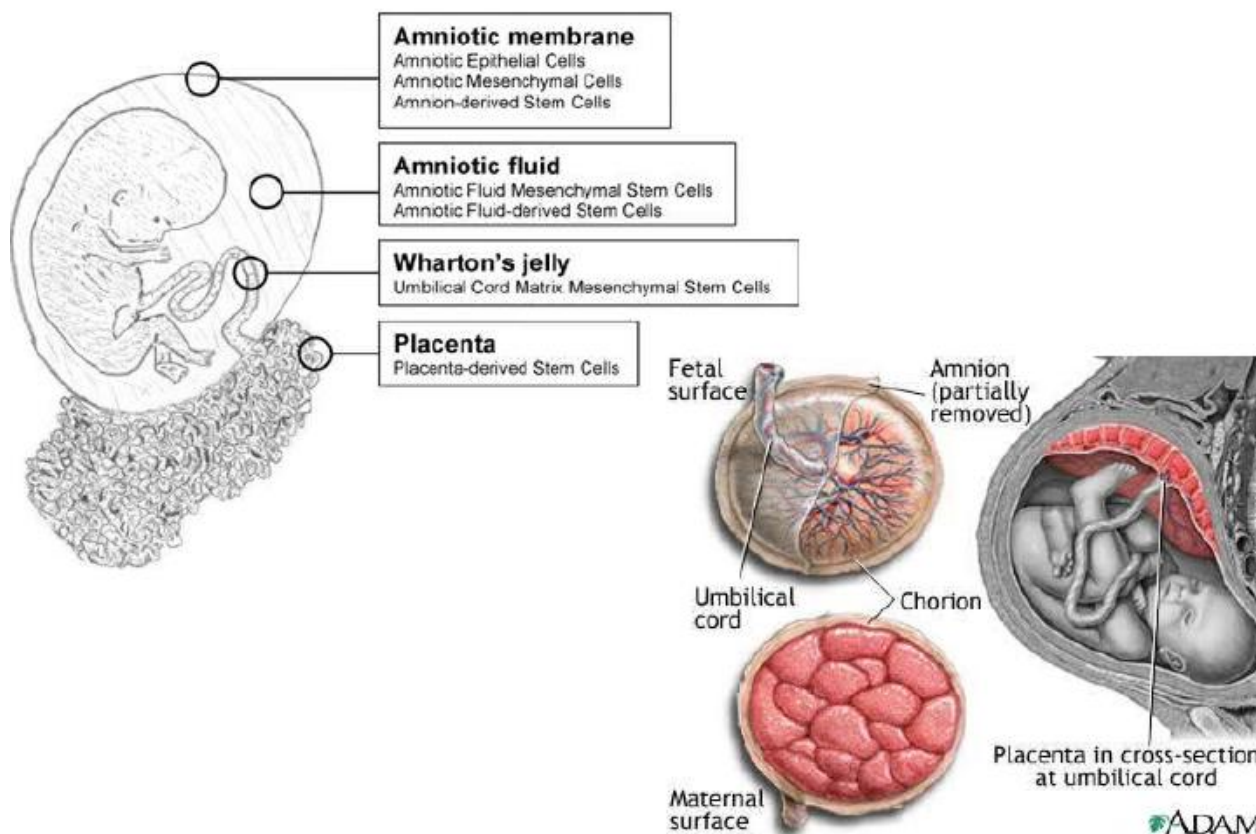


Рис 7. Источник экстраэмбриональных СК.

**Пуповинная кровь- источник стволовых клеток.** В настоящее время активные исследования ведутся в области размножения стволовых клеток пуповинной крови вне организма. Увеличение числа гемопоэтических стволовых клеток, содержащихся в единице пуповинной крови, позволит использовать ее для более крупных пациентов и даст более быстрое приживление стволовых клеток. Размножение стволовых клеток пуповинной крови происходит при использовании факторов роста и питания. Разработанная компанией ViaCell Inc. технология, называемая Selective Amplification, позволяет увеличивать популяцию стволовых клеток пуповинной крови в среднем в 43 раза. Ученые из ViaCell и университета Дюссельдорфа в Германии (University of Duesseldorf) описали новую действительно плюрипотентную популяцию клеток человеческой пуповинной крови, которую они назвали USSCs - unrestricted somatic stem cells – неограниченно делящиеся соматические

стволовые клетки (Kogler et al 2004). Как *in vitro*, так и *in vivo*, USSCs демонстрировали гомогенную дифференцировку в остеобласты, хондробласты, адипоциты, гемопоэтические и нервные клетки, в том числе астроциты и нейроны, экспрессирующие нейрофиламенты, белки каналов натрия и различные фенотипы нейротрансмиттеров. Хотя эти клетки еще не применялись в клеточной терапии людей, USSCs из пуповинной крови могут восстанавливать различные органы, в том числе головной мозг, кость, хрящ, печень и сердце.[41,42,44,46]

### Применение клеток пупочного канатика в медицине

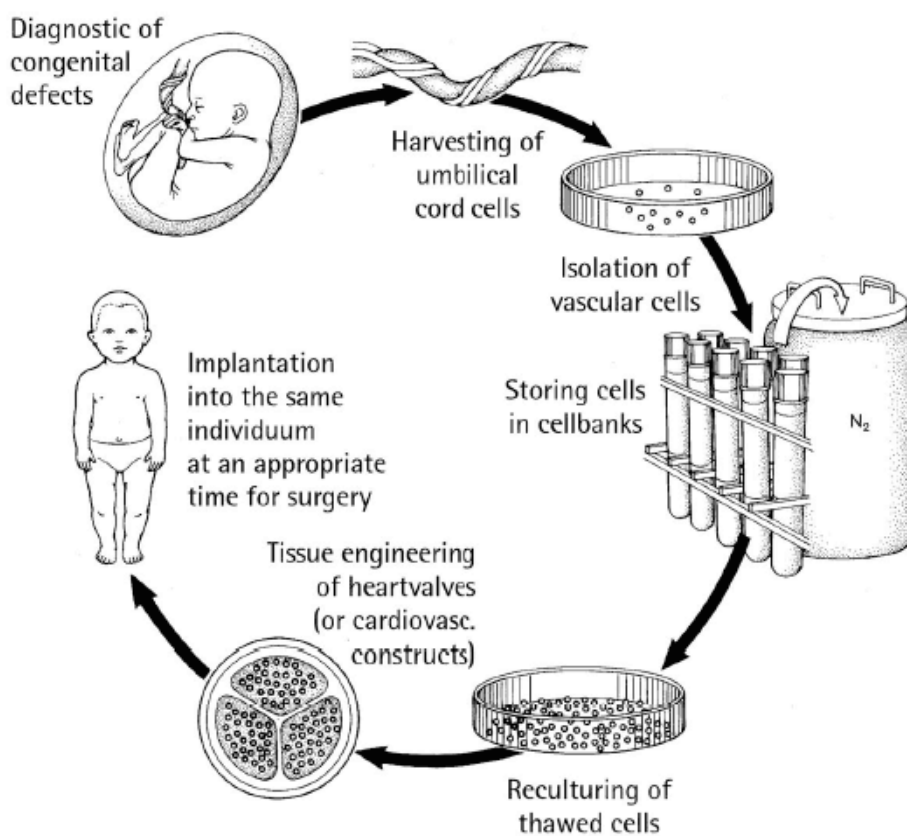


Рис 8. Применение клеток пупочного канатика в медицине.

Другой важной областью исследований является изучение способности стволовых клеток пуповинной крови к дифференцировке в клетки различных тканей, помимо гемопоэтической, и установление соответствующий линий стволовых клеток. [41][39]Исследователи из университета южной Флориды (University of South Florida (USF, Tampa, FL)) использовали ретиновую



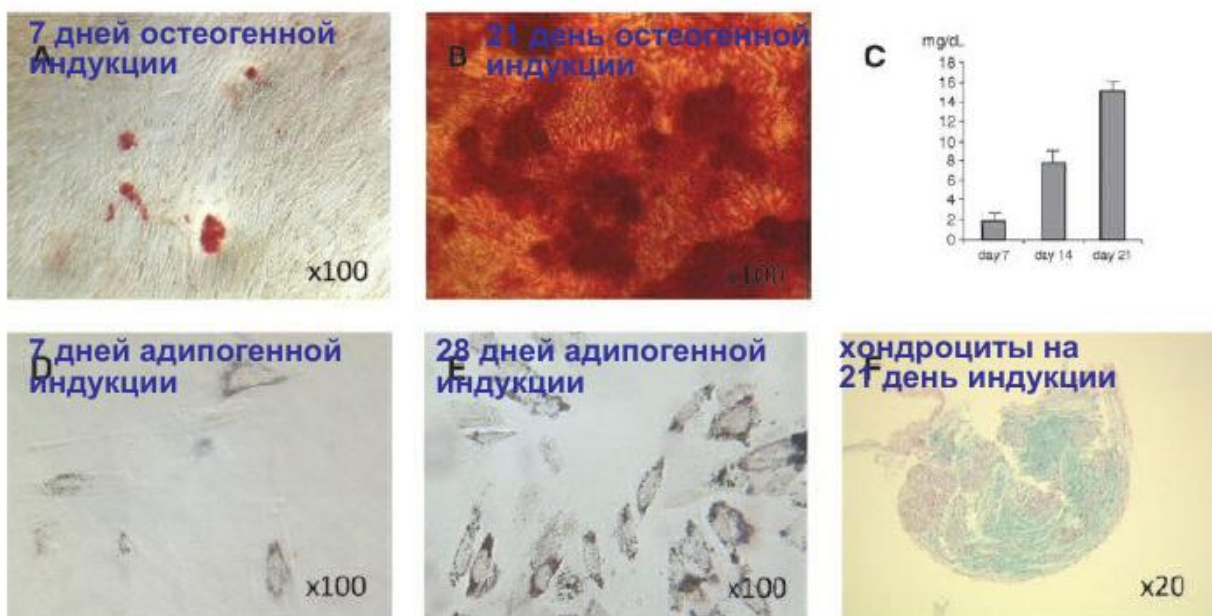
кислоту, чтобы заставить стволовые клетки пуповинной крови дифференцироваться в нервные клетки, что было продемонстрировано на генетическом уровне анализом строения ДНК. Эти результаты показали возможность использования этих клеток для лечения нейродегенеративных болезней. Пуповинная кровь для этой работы была предоставлена родителями ребенка; она была обработана в оснащенной на современном уровне лаборатории CRYO-CELL и фракционированные замороженные клетки были переданы ученым USF.[46] Пуповинная кровь оказалась источником гораздо более разнообразных клеток-предшественников, чем считалось раньше. Она может быть использована для лечения нейродегенеративных болезней, в том числе в сочетании с генотерапией, травм и генетических болезней. В ближайшем будущем станет возможным при рождении детей с генетическими дефектами собирать их пуповинную кровь, методами генной инженерии исправлять дефект и возвращать эту кровь ребенку. В 2004 году Конгресс США одобрил статьи бюджета, предусматривающие расход 9 млн \$ на дополнительный сбор пуповинной крови и 1 млн \$ на научные работы с ней в Институте медицины (Institute of Medicine (IOM)). 14 апреля 2005 институт опубликовал свой отчет, в котором рекомендовал Department of Health and Human Services организовать национальную сеть банков пуповинной крови, которая сможет обеспечить достаточное количество ГСК для трансплантации. Должны быть выработаны и утверждены правила для донорства, сбора и использования пуповинной крови, которые сейчас обычно не принимаются во внимание.[43-45] По оценке IOM к хранящимся в настоящее время в 40 банках пуповинной крови примерно 50 000 единицам пуповинной крови необходимо добавить еще 100 000 единиц. Разработка методов сбора и использования стволовых клеток пуповинной крови получила поддержку в США после того, как в мае 2005 года было принято президентское вето на использование человеческих ЭСК. Был внесен законопроект, предполагающий финансировать работы с пуповинной кровью в объеме 15 млн в 2006 году и 30 млн в 2007, с тем, чтобы собрать необходимые 150 000 единиц. Одним из препятствий к использованию стволовых клеток пуповинной крови остается то, что они дифференцируются в меньшее число различных тканей, чем ЭСК.

Периваскулярные клетки пуповины как источник МСК



Ученые из Института биоматериалов и биомедицинской инженерии университета Торонто (Institute of Biomaterials and Biomedical Engineering of the University of Toronto (Toronto, Canada)) обнаружили, что желеобразная соединительная ткань, окружающая кровеносные сосуды пуповины (Wharton's Jelly) богата мезенхимальными клетками-предшественниками и может быть использована для получения их в большом количестве за короткое время (Sarugaser et al 2005). [46,42] Периваскулярные (окружающие сосуды) клетки часто отбрасываются, поскольку основное внимание обычно бывает сосредоточено на пуповинной крови, в которой мезенхимальные стволовые клетки встречаются с частотой всего лишь одна на 200 миллионов. Но этот источник клеток-предшественников, позволяющий их размножить, может в значительной степени усовершенствовать трансплантации костного мозга. [39,40]

### Дифференцировка МСК-подобных клеток, из вартонова студия пупочного канатика



Bruyn et al., Stem Cells and Dev, 2011, V20, №3

Рис 9. Дифференцировка МСК.

**Процедура забора.** Пуповина пережимается через 30 секунд после рождения ребенка, плацента и пуповина отделяются, и пуповинную кровь собирают в специальный пакет. В образце должно быть не меньше 40 мл, чтобы его можно было использовать. Кровь типизируется по HLA и культивируется.

### **Сбор замораживание и хранение пуповинной крови**

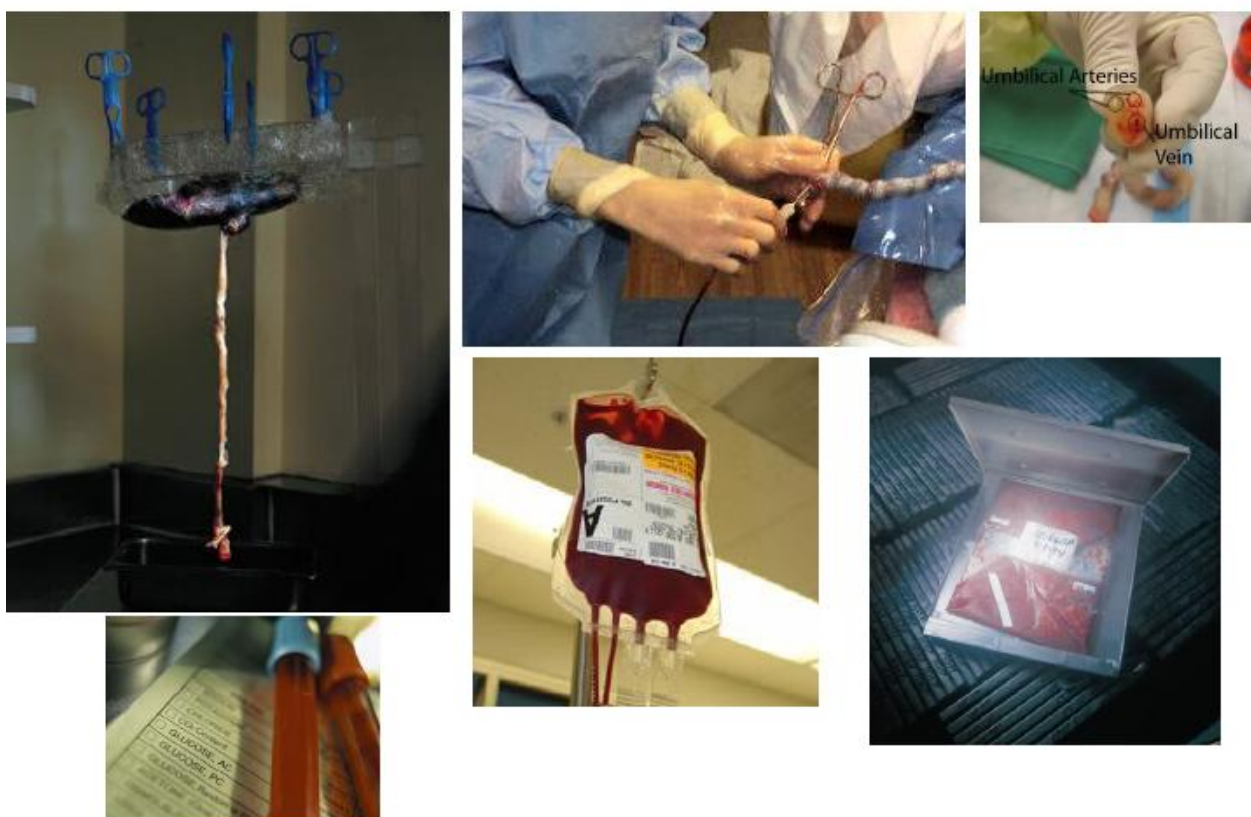
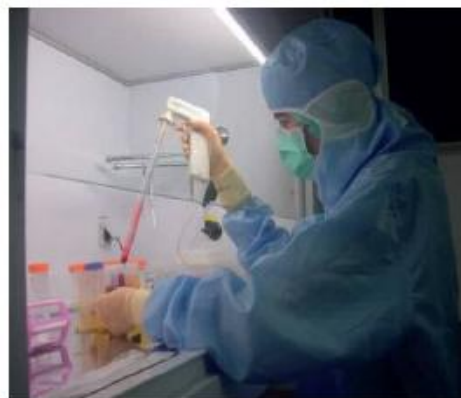


Рис 10. Сбор и хранение пуповинной крови.

Незрелые клетки человеческой пуповинной крови с высокой способностью к пролиферации, размножению вне организма и выживанию после трансплантации могут храниться замороженными более 15 лет, затем после оттаивания они с большой вероятностью сохраняют эффективность при клинической трансплантации (Врохтmeyer et al 2003).

## Банки пуповинной крови



1988 Элиан Глюкман

в клинике святого  
Людвика в Париже  
впервые провела  
трансплантацию  
пуповинной крови  
ребенку с анемией  
Фанкони



Элиан Глюкман — родоначальница  
клинического применения  
пуповинной крови

Рис 11. Банки пуповинной крови.

**Преимущества применения пуповинной крови в качестве источника стволовых клеток.** Ежегодно в мире происходит около 200 миллионов родов. Более 20 тысяч тонн пуповинной крови безжалостно уничтожается, не найдя достойного применения. Начиная с 1988 года, трансплантация (пересадка) клеток пуповинной крови прочно вошла в арсенал средств практической медицины. Этот, как теперь принято говорить, «альтернативный» источник не только не уступает костному мозгу (традиционному источнику клеток для трансплантации), но и превосходит его по целому ряду параметров. [39,40] Если число трансплантаций костного мозга на протяжении последних лет меняется незначительно, то доля трансплантаций клеток пуповинной крови неуклонно растет из года в год. Для сравнения, к 2006 году их было выполнено около 8 тысяч, в 2008 и 2010 – 12 и 24 тысячи, соответственно. Число трансплантаций, проведенных в мире на рубеже 2011-2012 гг., оценивается примерно в 30 тысяч. В Японии каждая вторая трансплантация выполняется с использованием клеток

пуповинной крови.[47,39,40] Современные подходы к идентификации и изучению гемопоэтических стволовых клеток основаны на анализе их потенциала *in vitro* (способности формировать различные ростки кроветворения) в сочетании с проточной цитофлуориметрией, позволяющей охарактеризовать их фенотип (определенный набор клеточных белков-маркеров). Основным маркером гемопоэтических стволовых клеток является CD34 – белок.[39,47]

Подобный фенотип характеризует гемопоэтические стволовые клетки вне зависимости от их источника: костного мозга, периферической или пуповинной крови. По способности к пролиферации и формированию колоний при культивировании *in vitro* стволовые клетки пуповинной крови значительно превосходят клетки из других источников. Стандартная для трансплантации доза ядерных клеток пуповинной крови, равная  $3-4 \times 10^7$  клеток/кг, содержит примерно столько же колоние-образующих единиц, сколько  $3-5 \times 10^8$  клеток костного мозга или стимулированной периферической крови, что позволяет выполнять трансплантацию при гораздо меньшем количестве вводимых общих лейкоцитов.[47,46,44]

Интересно, что содержание CD34-положительных клеток в пуповинной крови, обычно не превышающее 0.5%, существенно ниже их концентрации в костном мозге или стимулированной крови. [47]

Доза CD34-положительных клеток пуповинной крови также примерно в 10 раз меньше дозы аналогичных "взрослых" клеток. Объяснение этому факту: клетки пуповинной крови менее дифференцированы ("моложе") и обладают наивысшим потенциалом к росту и дифференцировке. Другие отличия стволовых клеток пуповинной крови заключаются в более высоком уровне экспрессии антигенов гистосовместимости II-го класса (HLA-DR), большей длине теломеров и более высокой активности теломераз. Поскольку сокращение длины теломеров рассматривается как один из признаков репликативного старения клеток, данные наблюдения свидетельствуют, что клетки пуповинной крови обладают большей способностью к длительному существованию в организме реципиента. [39]

Итоги спора между костным мозгом и пуповинной кровью подвели в своем недавнем обзоре руководители ЕВРОКОРД Элиан Глюкман и Вандерсон Роша. Цитируем: «По сравнению с другими источниками аллогенных (прим. – донорских) кроветворных стволовых клеток для трансплантации пуповинная кровь обладает существенными логистическими и клиническими преимуществами, такими как:[47,39,40]

1.существенно более скорая доступность банкированного трансплантата для пациентов, в среднем на 25-36 дней быстрее, чем в случае костного мозга;

2.расширение пула доноров за счет толерантности при 1-2 HLA-несовпадениях из 6 возможных (большее число несовпадений связано с меньшей вероятностью приживления);

3.меньшая частота и тяжесть реакции «трансплантат против хозяина»;

4.меньший риск передачи латентных вирусных инфекций;

5.отсутствие риска для донора;

6.и, наконец, более высокая, по сравнению с костным мозгом, частота нахождения редких гаплотипов для представителей этнических меньшинств»



**Плацента – источник стволовых клеток.** Доктор Роберт Харири, президент LifebankUSA и Celgene Cellular Therapeutics сказал следующее: "... плацента является важным и новым источником стволовых клеток, которые потенциально могут быть использованы для восстановления поврежденных органов человека".

### **Выделение стволовых клеток из плаценты и плодных оболочек**

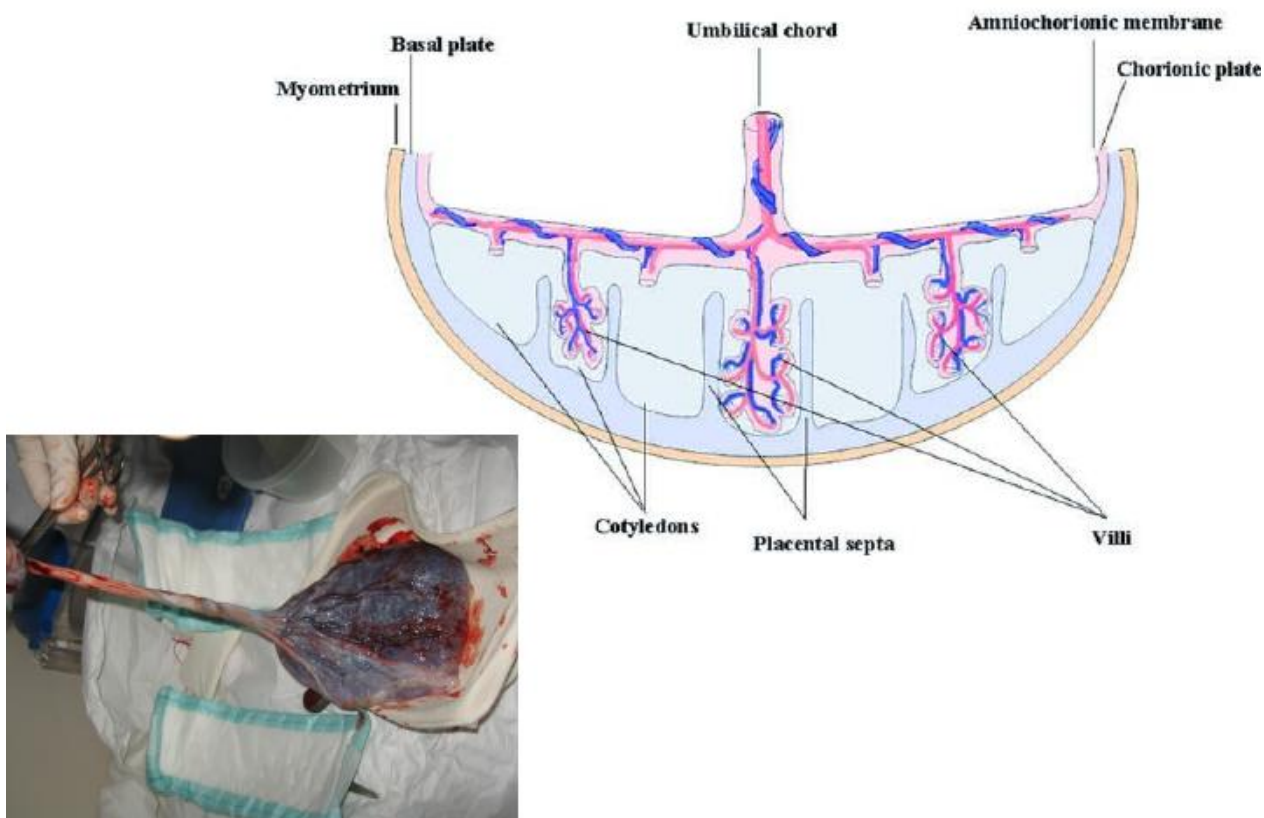


Рис 12. Выделение стволовых клеток из плаценты и плодных оболочек.

Celgene Corporation - известная биофармацевтическая компания на Международной конференции по исследованию стволовых клеток и применению их в терапии (Сан-Диего) объявила, что в плаценте человека имеются стволовые клетки, имеющие признаки "плюрипотентности", то есть возможности дать начало различным типам тканей. Ранее компанией уже был предложен и запатентован метод выделения стволовых клеток из плаценты. Преимуществами стволовых клеток плаценты являются доступность клеточного материала, безопасность для донора. При изучении стволовых клеток плаценты

Celgene Corporation выделяла эти клетки из плацент человека, которые были переданы в дар LifebankUSA после рождения нормальных, доношенных детей, по своему запатентованному методу перфузии, далее проводила культивирование клеток в питательной среде и фенотипическое исследование клеток по поверхностным маркерам. Также был проведен ряд полимеразных цепных реакций (ПЦР) для анализа экспрессии генов. В течение двух-четырех недель культивирования культивируемые клетки приобретали фибробластоподобную морфологию. Изучение морфологии и количественный анализ генов позволили установить, что клетки обладают признаками примитивных стволовых клеток и при определенных условиях культивирования эти клетки превращаются в хондроциты, адипоциты, нейроны, клетки крови и миоциты. Стволовые клетки плаценты по способности дифференцировки очень близки к мезенхимальным стволовым клеткам.[48,49,50,56,58,61,66]

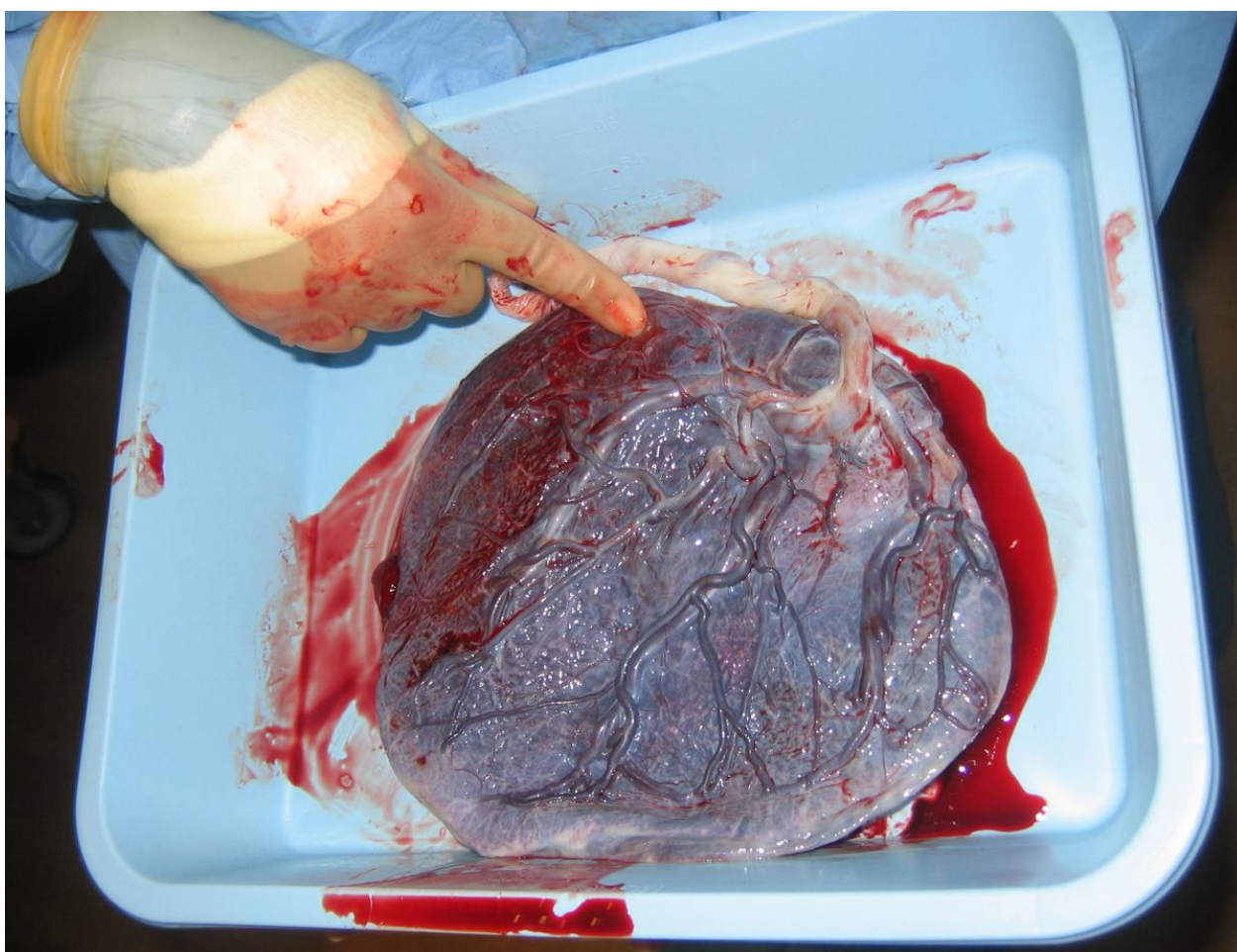


Рис 14. Человеческая плацента через несколько минут после родов.

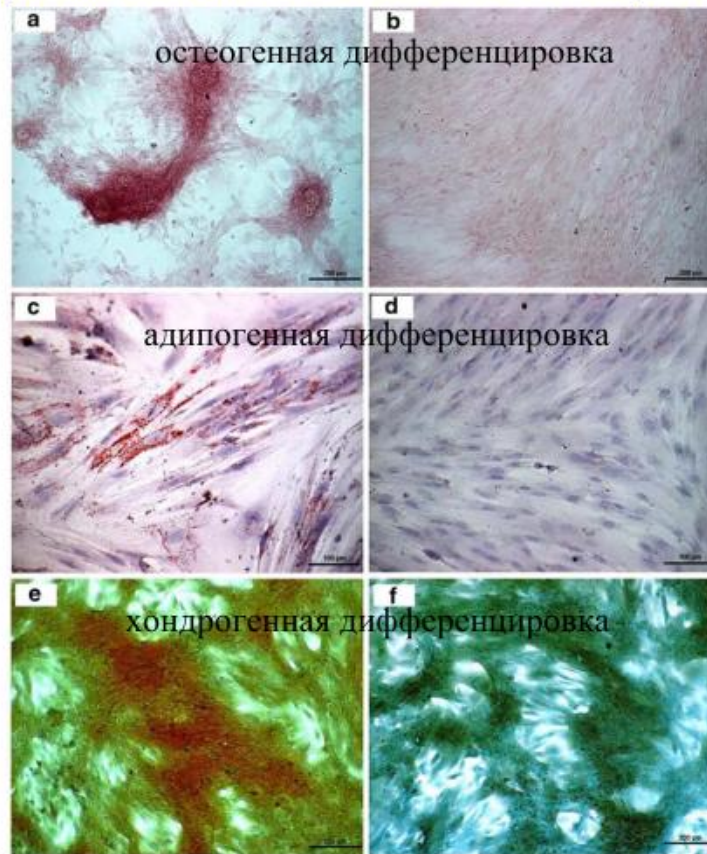
Пример получение стволовых клеток из плаценты.

30-31мая 2007г На Всероссийской и международной научной конференции «Стволовые клетки и перспектива их использования в здравоохранении» опубликован способ получения экстракта региональных стволовых клеток из тканей плаценты свиной для замещения поврежденных клеток. Способ осуществляется следующим образом. Плаценту, полученную при опоросе здоровой свиной с нормальными родами, для транспортировки в лабораторию помещали в стерильный сосуд с физиологическим раствором и антибиотиками. После доставки в лабораторию плаценту переносили в сосуд, содержащий 300 мл фосфатно-буферного раствора или раствора Хэнкса (рН 7,2). Плаценту промывали осторожным взбалтыванием в течение 1-2 минут, а затем переносили в другой сосуд с раствором Хэнкса. После трех-четырёхкратного отмывания в растворе Хэнкса плаценту стерильными ножницами измельчали на кусочки размером 2-3 см<sup>2</sup>. Затем заливали 150 мл 0,25% раствора трипсина. Трипсинизацию проводили на магнитной мешалке в течение 3 часов при 20°С, затем биомассу региональных стволовых клеток выращивают монослоем на среде 199 с последующей водно-солевой экстракцией.[48,63,64,66]

Проведенные опыты показали, что оптимальным режимом получения максимального количества клеточной массы является вариант трипсинизации с использованием температурного режима 20°С в течение 3 часов, позволяющий получить 115 млн. клеток на 1 г ткани. Затем клеточную массу региональных стволовых клеток переносили на среду 199 и выращивали монослоем с последующей водно-солевой экстракцией. [48,63,64,66]



## Дифференцировка клеток из *decidua basalis* плаценты человека



Huang Y-C. et al. (2009) Stem Cell Rev and Repr 5:247-255

Рис 15. Дифференцировка клеток плаценты.

**Амнион – источник стволовых клеток.** Ученые из Имперского Колледжа Лондона (Imperial College London) и Института Детского Здоровья при Университетском Колледже Лондона (University College London (UCL) Institute of Child Health) (Великобритания) показали, что стволовые клетки, содержащиеся в амниотической жидкости, можно трансформировать в плюрипотентные клетки, обладающие характеристиками, аналогичными таковым эмбриональных стволовых клеток (ЭСК). Ученым удалось перепрограммировать стволовые клетки амниотической жидкости без введения в их ДНК дополнительных генов, что позволяет рассматривать их как альтернативу ЭСК для использования в терапевтических и исследовательских целях. Результаты исследования были опубликованы в журнале *Molecular Therapy*. [106]

Амниотическая жидкость окружает и питает плод в утробе матери во время беременности. Получить жидкость можно через процедуру амниоцентеза (пункцию амниотической оболочки), которая в ряде случаев проводится для выявления генетических заболеваний плода.[106] Однако процедура несет достаточно высокий риск внутриутробной инфекции и прерывания беременности (распространенность этого осложнения составляет приблизительно 1:100 случаев). В амниотической жидкости содержится определенное количество стволовых клеток плода, у которых, однако, способность к дифференцировке более ограничена, нежели у ЭСК.[67,70]

В исследовании были использованы стволовые клетки амниотической жидкости, предоставленной женщинами, которым в период первого триместра беременности проводили процедуру амниоцентеза по медицинским показаниям. Клетки были культивированы на желатиновой белковой смеси, а затем перепрограммированы в более примитивное состояние путем внесения в культуральную среду вальпроевой кислоты. Детальное исследование полученных клеток показало, что они (так же, как и ЭСК) плюрипотентны, то есть способны дифференцироваться во все типы клеток человеческого организма.[106] Даже после длительного культивирования в лабораторных условиях перепрограммированные клетки были способны превращаться в функционирующие клетки различных типов, например, клетки печени, костной и нервной тканей. После криоконсервирования и культивирования после разморозки перепрограммированные стволовые клетки амниотической жидкости также оставались плюрипотентными.[106] Результаты исследования позволяют предположить, что стволовые клетки, полученные из амниотической жидкости, могут быть использованы для лечения различных заболеваний. Донорские клетки можно хранить в банках и применять в терапевтических целях, использовать при исследовании заболеваний и тестировании лекарственных препаратов. В одном из исследований было показано, что клетки, полученные от 150 доноров, способны обеспечить до 38% населения необходимым количеством стволовых клеток.[106]

Поиск альтернативы ЭСК был обусловлен этическими причинами и ограниченной доступностью донорских эмбрионов. Предыдущие исследования показали, что зрелые клетки можно превратить в плюрипотентные путем встраивания дополнительных генов в их ДНК, например, с помощью вирусных

векторов. Однако перепрограммирование имеет низкую эффективность, а также связано с риском роста опухолей из-за нарушений в ДНК.[106] В новом исследовании плюрипотентность человеческих клеток впервые была индуцирована без применения чужеродного генетического материала. Результаты показали, что для плюрипотентных клеток, полученных из стволовых клеток амниотической жидкости, характерны некоторые свойства ЭСК, которыми не обладают индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, полученные из других источников.[68,69]

«Стволовые клетки амниотической жидкости, обладают промежуточными свойствами между таковыми ЭСК и зрелых стволовых клеток. Они способны превращаться в различные типы клеток, но они не плюрипотентны. Мы показали, что они могут вернуться к состоянию плюрипотентности путем внесения химического реагента, модифицирующего конфигурацию ДНК таким образом, что гены, экспрессируемые у эмбриона, снова оказываются включенными», - говорит один из руководителей исследования доктор Паскаль Гийо (Pascale Guillot) из Имперского Колледжа Лондона.[106] Ученые особенно заинтересованы в изучении возможности использования таких клеток для ранней диагностики генетических заболеваний и других болезней, например, церебрального паралича. Кроме того, по словам исследователей, получение плюрипотентных стволовых клеток без генетических манипуляций является фактором, позволяющим отдать этим клеткам предпочтение при необходимости использования в терапевтических целях.[106]

Практически доказать, что амнион является источником стволовых клеток можно следующим образом. Клетки, выделенные из кусочков амниона путем ферментативного разрушения ткани и обладающие адгезивностью к пластику, наращивали в среде DMEM-F12 с добавлением 10% бычьей фетальной сыворотки. Полученные таким образом клетки имели фибробластоподобную морфологию.[67,70] Амнион плаценты человека состоит из эпителиальных клеток и соединительной ткани мезодермального происхождения. С целью определить иммунофенотип и установить таким образом тип полученных клеток, провели фенотипический анализ этих клеток. Было показано, что фибробластоподобные клетки амниона человека имеют иммунофенотип, схожий с мезенхимальными клетками костного мозга.[68] Эти данные

позволяют заключить, что культивируемые клетки амниона человека являются мезенхимальными клетками.

Экспрессия маркеров поверхности была изучена на разных пассажах мезенхимальных клеток амниона. Оказалось, что значимых изменений в экспрессии поверхностных маркеров не наблюдалось до 10 пассажа. Исключением явилась экспрессия МНС I класса, которая монотонно возрастала от пассажа к пассажи. Иммунофенотип клеток амниона выглядит следующим образом: CD54<sup>hi</sup>CD44<sup>hi</sup>CD90<sup>dim</sup>HLA-ABC1<sup>o</sup>HLA-DK-CD34<sup>-</sup>.



Рис 16. Человеческий зародыш в амнионе.

С целью оценить пролиферативные свойства мезенхимальных клеток амниона в культуре и проанализировать их способность к дифференцировке, определили уровни экспрессии таких внутриклеточных белков как нестин, характеризующий наивное, недифференцированное состояние клеток, и Ki67, который является маркером интенсивно делящихся клеток. Оказалось, что в популяции изучаемых клеток содержится около 50 % нестин-позитивных и 70% Ki67-позитивных клеток. Это говорит о том, что большинство изучаемых клеток не дифференцированы и пролиферируют.[70]

Основным критерием «стволовости» клеток служит их способность дифференцироваться в клетки разных зародышевых листков. С целью определить, являются ли мезенхимальные клетки амниона человека

стволовыми, изучили их способность дифференцироваться в клетки мезодермального происхождения - остециты и адипоциты, а также эктодермального происхождения - нервные клетки и эндодермального происхождения - гепатоциты.[68,69] Условиями адипогенной дифференцировки являлись наличие в среде культивирования дексаметазона, индометацина, инсулина и IBMX, а также 100% конфлюэнтность клеток перед добавлением дифференцировочной среды. Через 3 недели инкубации клеток в такой среде, с ее сменой каждые 3 дня, в клетках начали накапливаться жировые вакуоли, количество и размер которых к концу 4 недели заметно увеличивались. В случае остеогенной дифференцировки среда для культивирования была дополнена  $\beta$ -глицерофосфатом, дексаметазоном и фосфатом аскорбиновой кислоты. Инкубация клеток в дифференцировочной среде в течение 4 недель привела к увеличению экспрессии в клетках амниона маркерных белков остецитов - остеоонектина и костного сиалированного белка. Также была зарегистрирована активация щелочной фосфатазы, фермента, активность которого повышена в остеоцитах.[70]

Для дифференцировки клеток амниона человека в гепатоциты была использована среда, содержащая ростовые факторы HGF и OSM, а также инсулин, трансферин и дексаметазон. Через 4 недели инкубации клетки были проанализированы на экспрессию альбумина и  $\alpha$ -фетопротейна. Было обнаружено значительное увеличение экспрессии альбумина в клетках, культивированных в дифференцировочной среде, по сравнению с контрольными клетками. Однако в супернатанте клеток альбумина обнаружено не было, что говорит об отсутствии или слабой секреции этого белка.[68,69] Для проверки способности клеток амниона человека дифференцироваться в нервные клетки была использована среда, дополненная набором нейротрофных и ростовых факторов и гормонами (ретиноевая кислота, bFGF, EGF, NGF, NT-3, инсулин, гидрокортизон, прогестерон). Инкубация клеток амниона человека в течение 1 недели привела к заметному снижению уровня экспрессии нестина и увеличению экспрессии GFAP и  $\beta$ III-тубулина, характерных белков нервных клеток. Полученные результаты свидетельствуют о способности клеток амниона человека в определенных условиях дифференцироваться в клетки различного происхождения и позволяют заключить, что полученные клетки амниотической оболочки плаценты являются мультипотентными стволовыми

клетками, а амниотическая оболочка плаценты человека - альтернативным источником МСК.[68,70]

### **Альтернативные методы выявления стволовых клеток.**

Генетическая идентификация стволовых клеток. В настоящее время ученые отличают стволовые клетки по их поведению в культуре и по химическим маркерам на клеточной поверхности. Однако гены, ответственные за проявление этих особенностей, в основном остаются неизвестными. Недавнее исследование биологов из Принстона обнаружило два сета генов, придающих стволовым клеткам их замечательные качества. Они определили 283 гена, наиболее обычных в нескольких самых важных типах стволовых клеток, а также около 4000 генов, активных в тканях, которые окружают и питают стволовые клетки и дают им сигналы к началу дифференцировки. База данных по этим генам опубликована в Интернете и доступна бесплатно. В одном из этих исследований определен основной набор генов, которые обычны для фетальных стволовых клеток из различных органов. Ученые также сравнили человеческие и мышьи кроветворные стволовые клетки и установили основной набор генов, обычный для стволовых клеток этих двух видов (Ivanova et al 2002). В центре внимания других работ были клетки, окружающие, питающие и поддерживающие стволовые клетки в недифференцированном состоянии, известные как микроокружение, или ниша, стволовых клеток (Hackney et al 2002). Эти авторы сравнивали гены, активные в клетках окружения, с генами, активными в других клетках. Они обнаружили более 4000 генов, активных в клетках микроокружения стволовых, но не активных во всех других клетках. Исследователи начали совмещать эти два подхода, одновременно анализируя активность генов в стволовых клетках и клетках их окружения (ниши). Однако они отмечают, что для точного определения функций каждого гена необходимо взаимодействие и объединение усилий многих научных групп. Полный каталог генов стволовых клеток может улучшить процесс идентификации, а также прояснить механизмы функционирования этих клеток. Эти результаты обещают стать важным источником для биологических и медицинских исследований, целью которых является использование стволовых клеток в лечении неврологических болезней, врожденных дефектов, болезней сердца, онкогематологических заболеваний и многих других.[69,70,89,101,94]

### **III. Стволовые клетки в лечение заболеваний глаза.**

Лечение глазных болезней - это одна из тех областей, где очень эффективным является применение стволовых клеток.[49,71]

Глазных болезней множество. Глаукома, дистрофия желтого пятна, тапеторетинальные дистрофии (тапеторетинальные дегенерации, тапеторетинальные абнотрофии), воздействие диабета разрушают фоторецепторы и другие нейроны в сетчатой оболочке, внутренней выстилке обратной стороны глазного яблока. Но нейроны глазного яблока не восстанавливаются естественным путем. Если же нейроны повреждаются, то они, как и зрение людей с глазными болезнями, пропадают навсегда. Однако ученые обнаружили свойство стволовых клеток восстанавливать поврежденную сетчатку глаза, что и применяется для лечения глазных болезней. Стволовые клетки мигрируют в область повреждения, соединяются с тканью и дифференцируют в клетки глаза соответствующего вида. При травмах глаза учеными используются стволовые клетки для того, чтобы запустить процесс регенерации сетчатки.[88,89,99,101,104] Тапеторетинальные дистрофии (тапеторетинальные дегенерации, тапеторетинальные абнотрофии), атрофию зрительных нервов, астигматизм и другие глазные болезни лечат введением стволовых клеток непосредственно в глаз, что увеличивает эффективность лечения глазных заболеваний.[74,83,88,98]

В настоящее время стволовыми клетками лечат следующие заболевания глаз:

- **тапеторетинальная дистрофия**
- **атрофия зрительных нервов**
- **астигматизм**
- **травмы глаз**
- **ожоги глаз**

Однако существуют глазные болезни, не поддающиеся лечению стволовыми клетками - это катаракта и глаукома. Стволовые клетки на сегодняшний день применяются при лечении атрофии зрительного нерва и пигментной дегенерации сетчатки. Культура стволовых клеток источником которых может являться плацента, пуповина новорожденного, амнион, вводится ретробульбарно и в субтеноновые пространства обоих глаз. При отсутствии

эффективности от традиционной терапии клеточная терапия является эффективным и патогенетическим способом лечения.[49,55,57,63,71]

**Использование стволовых клеток пуповина-плацентарного комплекса в лечение заболеваний глаза.** Поиск новых эффективных методов лечения патологии глаза чрезвычайно актуален для современной офтальмологии, поскольку нарушение структурной организации и функциональной активности галаза неизбежно приводит к безвозвратной потере зрения.[49,50,61,64,89,90]

В последнее десятилетие во всем мире наблюдается устойчивая тенденция: количество заболеваний глаз у пациентов всех возрастных групп стремительно увеличивается. Такая тенденция не удивительна, если учитывать уровень стрессов, колоссальные зрительные нагрузки, проживание в экологически неблагоприятной среде, обеднение продуктов питания жизненно необходимыми для организма биологически активными веществами и другие не менее важные обстоятельства, приводящие к ухудшению здоровья в целом и состояния глаз в частности. Следует также учитывать увеличение средней продолжительности жизни и связанное с этим постарение человеческой популяции, на фоне которого значительно повышается частота выявления патологий зрительного нерва и сетчатки, обусловленных возрастными изменениями органа зрения.[88,90,94,97]

В настоящее время для лечения офтальмологических заболеваний предложен широкий спектр методов, среди которых значительное распространение получила и медикаментозная терапия. Следует отметить, что отсутствуют достаточно эффективные методики лечения прежде всего дегенеративных процессов в сетчатке и зрительном нерве. В этой связи в последние годы активно обсуждается использование клеточных технологий.[48,51,63,99]

Стволовые клетки обладают высокими пролиферативными способностями и представляют собой самоподдерживающуюся популяцию клеток, способных дифференцироваться в различных направлениях, и занимают самую начальную степень гистогенетического ряда. Среди изучаемых направлений в различных областях медицины в последние годы внимание привлекает применение стволовых клеток пуповинной крови и плаценты. Клетки пуповинной крови и плаценты представляют собой уникальную клеточную популяцию, отличающуюся от клеток, получаемых из других источников, в том числе,



эмбриональных, фетальных и «взрослых». Их уникальность заключается в том, что это единственный тип клеток постнатального происхождения, способный при трансплантации поддерживать кроветворение и формировать полноценную иммунную систему человека, благодаря образованию В- и Т-лимфоцитов и дендритных клеток, формированию первичных и вторичных лимфоидных органов и продукции функциональных иммунных ответов.[48,49,50,66,89,92,96,99]

Изучив большое количество работ в которых для лечения заболеваний глаза используются стволовые клетки, была составлена таблица:

Таблица 2. Виды СК применяемые в лечение глазных патологии.

<b>Diseases</b>	<b>Donor cell type (species)</b>	<b>Target (species)</b>	<b>Outcomes</b>
Retinal degeneration	h/mBM-SCs	Retinal cells (m)	Retinal degeneration rescued
	hBM- somatic cells	Photoreceptors (r)	These cells were differentiated into 3–6 layers of photoreceptors
	rBM- MSCs hPTC	Retinal cells (r)	Grafted cells expressed a rod photoreceptor and bipolar and amacrine cell markers
	Primate ESCs	Primate retinal cells	Co- culturing ESCs with ESC-derived RPE cells is efficient for inducing photoreceptors
	MESCs	Retinal cells (m)	ESCs differentiates to various retinal cell types
Neural retina repair	mPostmitotic rod photoreceptor precursor cells	Rod photoreceptors (m)	Photoreceptors were present up to 12 months post-transplantation
Retinitis pigmentosa	mBM-MSCs hPTC	Microglia (m)	These microglia plays a protective role in retinitis pigmentosa
Retinitis pigmentosa and AMD	hiPSCs hUTC hPTC	hRPE(culture)	iPSCs differentiate into functional RPEs which are comparable to fetal and ESC-RPE
AMD (clinical) Age-reltaed macular degeneration	Autologous Hrpe	Subfoveal space (h)	Autologous RPE transplantation restores vision in neovascular AMD
	Autologous Hrpe	Macula (h)	Postoperative vision ranged

			from 20/200 to 20/64 with a 2-line increase in three patients.
Retinal dystrophy	hESCs hUTC	hRPE (r)	Improvement in visual performance was 100% over untreated controls
Glaucoma	hMSCs	Retinal ganglion cells (r)	BM-MSCs deliver neurotrophic factors and neuroprotection
Photoreceptor loss	hUTC, hPTC, hADF and hMSC	Photoreceptors (r)	Umbilical tissue-derived cells gave large areas of photoreceptor rescue; mesenchymal stem cells gave only localized rescue
	hRPE	Photoreceptors, rods and cones (r)	Partial preservation of rod and cone electroretinogram function
	hRPE/ hSCs	Photoreceptors (r)	hRPE and hSC grafts can survive and rescue photoreceptors
Macular degeneration	hESC- derived RPE hUTC	Photoreceptors (m/r)	The cells sustained visual function and photoreceptor integrity

Key:

AMD — Age-related macular degeneration

h — human (may added in before abbreviations)

m — mouse (may added in before abbreviations)

r — rat (may add in before abbreviations)

BM-SC — bone marrow stem cells

iPSC — induced pluripotent stem cells

ESC — embryonic stem cells

RPE — retinal pigment epithelium

UTC — umbilical cord tissue-derived cells

PTC — placenta tissue-derived cells

ADF — adult dermal fibroblasts

MSC — mesenchymal stem cells

SC — stem cells

Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol (2011) 249:1439–1448

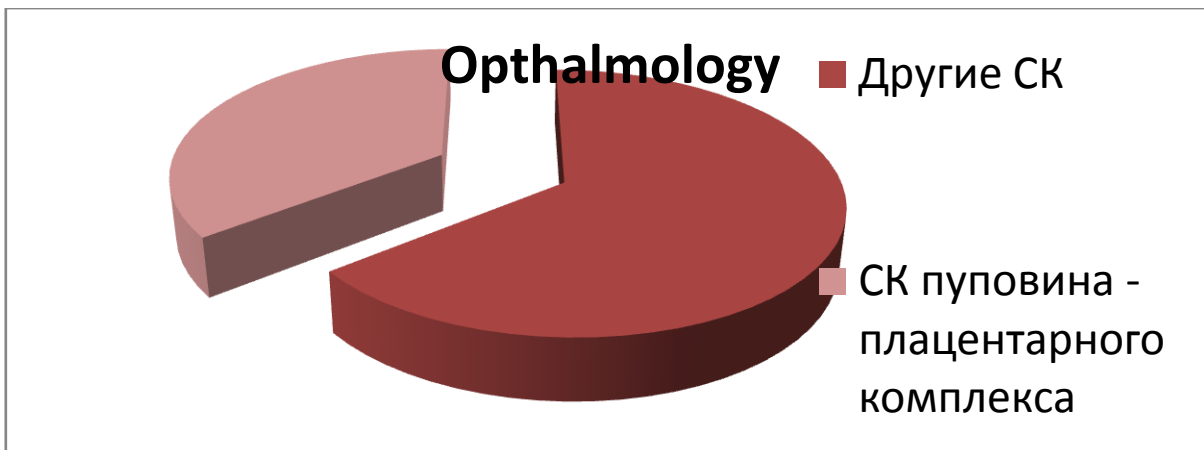


Диаграмма 2. Условное соотношение использования стволовых клеток пуповина- плацентарного комплекса и стволовых клеток из иных источников в лечение заболеваний глаз.

**Лечение сетчатки глаза при помощи стволовых клеток.** Исследователи из Университета Джона Хопкинса (Johns Hopkins University, США) получили человеческие индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), способные восстанавливать поврежденную ткань сетчатой оболочки глаза у мышей. Стволовые клетки, полученные из человеческой пуповинной крови и трансформированные в эмбрионо-подобное состояние, были культивированы с помощью нового метода, а не традиционно используемого способа с применением вирусных векторов, вызывающих мутации генов и инициирующих появление раковых клеток. Более безопасный метод культивирования ИПСК, полученных из сохраненных стволовых клеток пуповинной крови, позволит совершить прорыв в области регенеративной медицины.[107] В статье, недавно опубликованной в журнале *Circulation*, специалист в области клеточной биологии доктор Элиас Замбидис (Elias Zambidis) и его коллеги описывают лабораторные эксперименты, которые они проводили с человеческими ИПСК, полученными без применения вирусных векторов. Впервые такой метод получения ИПСК был описан в 2011 г. «Мы начали со стволовых клеток, полученных из пуповинной крови и имеющих малое количество приобретенных мутаций и небольшую, если она вообще была, эпигенетическую память, накапливаемую клетками с течением времени», – говорит Замбидис, доцент онкологии и педиатрии из Института Клеточной Инженерии при Университете Джона Хопкинса (Johns Hopkins Institute for Cell Engineering, США) и Онкологического Центра Киммель (Kimmel Cancer Center,

США). Ученые трансформировали клетки в состояние, характерное для клеток 6-дневного эмбриона.[107] Для доставки генов, включающих процессы, необходимые для трансформации клеток в стволовое состояние, ученые вместо вирусов использовали плазмиды – двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК, как правило, встречающиеся у бактерий и способные быстро реплицироваться. Затем, по наличию поверхностных белков CD31 и CD146, ученые выявили среди ИПСК высококачественные мультипотентные васкулярные стволовые клетки, способные образовывать сеть кровеносных сосудов, необходимую для восстановления сетчатки человека и других тканей в его организме. По словам Замбидиса, их группе удалось получить в два раза больше активно функционирующих васкулярных стволовых клеток, по сравнению с применением других методов работы с ИПСК. По его мнению, еще более важным был тот факт, что «эти клетки внедрялись и интегрировались в функционирующие кровеносные сосуды поврежденной сетчатки мышей».[107] Команда Замбидиса вводила васкулярные стволовые клетки мышам с поврежденной сетчаткой, светочувствительной частью глазного яблока. Клетки были введены непосредственно в глаз, синус, прилежащий к глазу, и в хвостовую вену. Когда ученые сфотографировали сетчатку мышей, то оказалось, что клетки внедрялись и восстанавливали кровеносные сосуды сетчатой оболочки грызунов вне зависимости от способа их введения в организм.[107] По словам ученых, ИПСК, полученные ими из клеток пуповинной крови, обладают аналогичной способностью восстанавливать поврежденные ткани сетчатки, как ИПСК, полученные из человеческих эмбрионов. Ученые планируют провести дополнительные эксперименты, направленные на оценку возможности применения полученных ими ИПСК для экспериментального лечения сахарного диабета у крыс. По словам Замбидиса, он часто предоставляет другим лабораториям ИПСК, полученные в его лаборатории из пуповинной крови. Спрос на клетки неуклонно растет. «Популярная точка зрения, согласно которой терапия ИПСК должна быть специфичной для каждого пациента, может быть неверной», – говорит Замбидис. Так, недавно было продемонстрировано, что эффективность применения частично совместимых и полностью совместимых трансплантатов костного мозга у человека одинакова.[107]

«Увеличивается число специалистов, поддерживающих идею создания крупного банка ИПСК, доступ к которому будут иметь ученые из разных стран», - говорит Замбидис. Однако, чтобы реализовать этот проект, потребуются большие ресурсы и повышенный контроль качества распространяемых клеток. В то же время, по словам Замбидиса, именно это сейчас пытаются сделать японские ученые под руководством пионера в области изучения стволовых клеток Шинья Яманака (Shinya Yamanaka), создавая банк стволовых клеток, полученных из образцов пуповинной крови, предоставляемых японскими банками крови.[107]

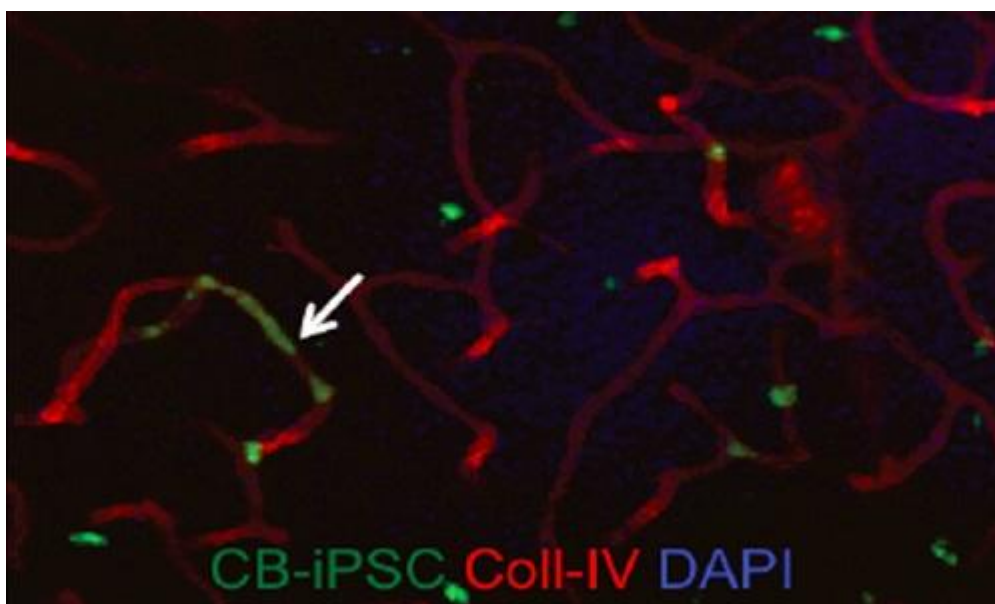


Рис 17.Регенерировавший сосуд сетчатки. Белые стрелки указывают на васкулярные стволовые клетки, полученные из ИПСК, внедряющиеся в поврежденные кровеносные сосуды сетчатки и восстанавливающие их. (фото: Imran Bhutto, Johns Hopkins Wilmer Eye Institute) По материалам Johns Hopkins Medicine

**История Рейлы Барлетт.** Очень красивая, веселая и... слепая. Это выдержка из текста, помещенного на сайте фонда «Надежда Рейлы». Рейла Барлетт родилась в городе Джоплин (США, штат Миссури) 6 лет назад. В возрасте нескольких месяцев ей был поставлен страшный диагноз – слепота вследствие врожденной гипоплазии зрительных нервов. Прогноз врачей был неутешительным: ребенок никогда не будет видеть. Отчаяние толкало родителей на поиск лечения, и в

Интернете они наткнулись на терапию клетками пуповинной крови, практикующуюся в Китае. Кстати, подобное лечение не разрешено в США. Только два врача – офтальмолог Ларри Брадерс и педиатр Фред Вилер поддержали родителей девочки.

Говорит мать Рейлы: «Никогда не забуду слова доктора Вилера. Когда я спросила, что он думает по поводу лечения пуповинной кровью, он сказал: если решение существует – это клеточная терапия».

Стоимость пяти инъекций клеток из китайского банка пуповинной крови составляет около 200 тысяч долларов. И американцы начали сбор денег, создав фонд «Надежда Рейлы» [113]. 4 июля девочка получила первую инъекцию клеток, а 11 июля, то есть спустя неделю, стала различать свет. Всего Рейле сделали 4 инъекции пуповинной крови в спинномозговой канал, по 10 млн. клеток каждая.

Говорит Ларри Брадерс, офтальмолог: «Ее зрительные нервы не функционировали. Дети с гипоплазией зрительных нервов, к сожалению, никогда не смогут нормально видеть. Случай Рейлы – первый, не считая чудесных библейских исцелений, когда зрение начало восстанавливаться». Рейла начала различать лицо мамы [114]

## **Выводы.**

- 1) Пуповина – плацентарный комплекс, как источник СК обладают рядом преимуществ.
- 2) СК пуповина – плацентарного комплекса являются серьезной альтернативой аналогичным клеткам, выделенным из костного мозга и других источников.
- 3) СК пуповина – плацентарного комплекса успешно используются в лечение заболеваний глаза.

Минусы и то над чем ещё предстоит работать:

### **Стволовые клетки в медицине,**

- количество экспериментов с СК на человеке мало**
- не знаем о долговременных эффектах СК**
- не знаем о реакции микроокружения в зоне инъекции**
- СК способны индуцировать опухоли или рост эктопической ткани**

### **Общее заключение.**

Рассмотрев в данной работе проблемы использования в медицине стволовых клеток, можно сделать следующие краткие выводы.

В последние годы наметился существенный интерес к такому направлению медицины, как клеточная терапия. Основой для развития клеточной терапии являются стволовые клетки, способные в зависимости от микроокружения превращаться в клетки разных органов и тканей. Одна такая клетка может дать

множество функционально активных потомков. В настоящее время в мире активно разрабатываются подходы к культивированию стволовых клеток, а также интенсивно исследуются возможности их генетической модификации. Список болезней, при лечении которых клеточные технологии уже используются или их применение планируется в ближайшем будущем, быстро растет. В этот список, по-видимому, войдут все болезни, практикуемое медикаментозное лечение которых малоэффективно. Одним из типов стволовых клеток являются мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, открытые еще в 70 - х годах прошлого века, но только сейчас их начали использовать в экспериментальной медицине и клинике. Классическим источником ММСК является костный мозг, но, наряду с ним, ММСК могут быть выделены и из других тканей: пуповины, жировой ткани, тканей эмбриона, слизистой оболочки носоглотки, амниона, плаценты, плацентарной и пуповинной крови новорожденных. Причем, клетки, полученные из разных источников, не отличаются ни по основным морфологическим признакам, ни по способности дифференцироваться в остециты, хондроциты, адипоциты и другие типы клеток соединительной ткани при воздействии соответствующих биологических агентов. Фетальные органы являются наиболее богатыми источниками ММСК. Однако актуальным остается вопрос эффективного получения клеток с характеристиками ММСК из доступных источников, не связанных с этическими или иными ограничениями. В этом отношении особое внимание привлекает плацента. Плацента, которая является органом, происходящим из тканей, как матери, так и плода, может быть получена неоперативным путем без высокого риска инвазивности. При этом удается получить из плаценты на порядок больше клеток, чем из других источников. После родов плаценту можно сохранять в лаборатории и получать клетки даже спустя несколько дней. Выделение ММСК из послеродовых тканей позволит создавать более «богатые» персональные семейные клеточные банки. Получение ММСК из плаценты может стать новой уникальной услугой криобанков пуповинной крови. ММСК плаценты могут явиться серьезной альтернативой аналогичным клеткам, выделенным из костного мозга взрослых и пуповинной крови. [116]

Стволовые клетки, присутствующие в пуповинной крови и тканях пуповины, обладают способностью к самообновлению и дифференцировке в обе ветви



кроветворения: лимфоциты, обеспечивающие иммунитет, и миелоциты, продуцирующие нейтрофилы, моноциты, эритроциты и тромбоциты. Точно оценить содержание стволовых клеток, особенно, самых примитивных их форм, в пуповинной крови не представляется возможным. Об их количестве можно судить лишь с помощью выявления отдельных белковых маркеров этих клеток (например, CD34), либо с помощью специальных тестов *in vitro*. Костный мозг был первым источником стволовых клеток, который был использован для трансплантации, однако, уже в начале 80-х годов стало известно, что стволовые клетки можно в достаточном количестве получать и из периферической крови, мобилизуя их с помощью ростовых факторов. После ряда биологических и клинических исследований стало очевидным, что богатым источником стволовых клеток является и пуповинная кровь. Хотя пуповинная кровь содержит в среднем меньше клеточных элементов, чем другие источники, по содержанию стволовых клеток она превосходит их. Об этом свидетельствует меньшая доза клеток пуповинной крови, необходимая для трансплантации.

Результаты исследования позволяют предположить, что стволовые клетки, полученные из амниотической жидкости, могут быть использованы для лечения различных заболеваний. Поиск альтернативы ЭСК был обусловлен этическими причинами и ограниченной доступностью донорских эмбрионов. Предыдущие исследования показали, что зрелые клетки можно превратить в плюрипотентные путем встраивания дополнительных генов в их ДНК, например, с помощью вирусных векторов. Однако перепрограммирование имеет низкую эффективность, а также связано с риском роста опухолей из-за нарушений в ДНК. В новом исследовании плюрипотентность человеческих клеток впервые была индуцирована без применения чужеродного генетического материала. Результаты показали, что для плюрипотентных клеток, полученных из стволовых клеток амниотической жидкости, характерны некоторые свойства ЭСК, которыми не обладают индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, полученные из других источников. Стволовые клетки амниотической жидкости, обладают промежуточными свойствами между таковыми ЭСК и зрелых стволовых клеток. Они способны превращаться в различные типы клеток, но они не плюрипотентны. Показано, что они могут вернуться к состоянию плюрипотентности путем внесения химического реагента, модифицирующего конфигурацию ДНК таким образом, что гены, экспрессируемые у эмбриона, снова оказываются включенными. Ученые особенно заинтересованы в изучении возможности использования таких клеток для ранней диагностики генетических заболеваний и других болезней. Кроме

того, по словам исследователей, получение плюрипотентных стволовых клеток без генетических манипуляций является фактором, позволяющим отдать этим клеткам предпочтение при необходимости использования в терапевтических целях.[106] Стволовые клетки на сегодняшний день применяются при лечении атрофии зрительного нерва и пигментной дегенерации сетчатки и других заболеваниях глаз. Культура стволовых клеток источником которых может являться плацента, пуповина новорожденного, амнион, вводится ретробульбарно и в субтеноновые пространства обоих глаз. При отсутствии эффективности от традиционной терапии клеточная терапия является эффективным и патогенетическим способом лечения. Открытие стволовой клетки и развитие связанных с этим открытием клеточных технологий в медицине наряду с расшифровкой двойной спирали ДНК и генома, безусловно, относятся к важнейшим событиям, произошедшим в биологии в XX веке. Стволовые клетки таят в себе невиданные возможности: от регенерации поврежденных органов и тканей до лечения заболеваний, не поддающихся лекарственной терапии. Кроме восстановления утраченных функций органов и тканей, стволовые клетки способны тормозить неконтролируемые патологические процессы, такие как воспаления, аллергии, онкологические процессы, старение и т.д.[109] Именно клеточные технологии являются основой генной терапии, с которой связаны надежды на разработку индивидуальных схем лечения пациентов с самыми тяжелыми заболеваниями, в том числе наследственными. Клеточные технологии и генная терапия представляют собой наиболее универсальные современные подходы к лечению. Технология стволовых клеток может привести к новому пониманию развития и дифференциации клеток, как и почему развиваются определенные ткани, почему возникают заболевания и как их лечить. Станет возможным клонирование от отдельных тканей до целых организмов.[109] Таким образом, наглядно демонстрирующих реальное значение клеточной биологии в решении актуальных проблем медицины XXI века, может быть продолжен. Вместе с тем уже сейчас становится очевидным, что дальнейший прогресс как самой клеточной биологии, так и медицинской науки в целом будет связан не только и не столько с дальнейшим накоплением фактического знания, сколько с его творческим и этическим осмыслением. Медицина XXI века, безусловно, будет основана на фундаментальных достижениях клеточной биологии.[109]

## Библиография

1. A .BIOSTEM .Стволовые клетки в офтальмологии.biostem.com
2. A Timothy A Blenkinsop, Barbara Corneo, Sally Temple & Jeffrey H Stern\* Ophthalmologic stem cell transplantation therapies.
3. A NIH Stem Cell Basics. NIH is the nation's medical research agency— supporting scientific studies that turn discovery into health. <http://www.nih.gov>
4. АП medforce . Стволовые клетки: история и перспективы. <http://medforce.ru>
5. А Маклакова, Ирина Юрьевна , кандидат медицинских наук . Влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из плаценты, на регенерацию быстрообновляющихся тканей зрелых и старых лабораторных животных при воздействии экстремальных факторов тема диссертации и автореферата по ВАК 14.03.03
6. Bio Pro Stem . Классификация стволовых клеток. BioPro Stem Technology. <http://biopro-st.com>
7. Bloob Flow. Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2003, 23:780-785.
8. Виды стволовых клеток. [trans-t.ru](http://trans-t.ru)
9. Bioinformatix. Стволовые клетки. Полная классификация с пояснениями. [Bioinformatix.ru](http://Bioinformatix.ru)
10. Bankplus. История термина стволовые клетки. <http://cordbankplus.com>
11. History of Stem Cell Research. [explorestemcells.co.uk](http://explorestemcells.co.uk)
12. Stem Cells: A Primer. National Institutes of Health, May 2000, <http://www.nih.gov/news/stemcell/primer.htm>
13. Корочкин Л.И Что такое стволовые клетки // Природа 2005 №6.
14. The Use of Embryonic Stem Cells in Therapeutic Research. Report of the IBC on the Ethical Aspects of Human Embryonic Stem Cell Research. Rapporteurs: Alexander McCall Smith, Michael Revel. Paris: UNESCO International Bioethics Committee, 6 April 2001. P. 4
15. National Institutes of Health Guidelines for Research Using Human Pluripotent Stem Cells, effective Aug 25, 2000, corrected Nov 21, 2000. <http://www.nih.gov/news/stemcell/stemcellguidelines.htm>
16. Жиганова Л.П. Биомедицина и стволовые клетки.

17. Cell by Sean Martin 'Stem cell decision: what will it mean? Government funding - or not - carries big meaning', / WebMD Medical News, Aug. 9, 2001
18. Отраслевая Программа «Новые клеточные технологии - медицине»(01.07.2002 – 01.07.2010)
19. 'Cloning and Stem Cell Research: Too High a Price', by Edmund Pellegrino. Sept. 29, 2000. Medline Plus.
20. Cell NI . Stem Cells: A Primer. National Institutes of Health, May 2000.  
<http://www.nih.gov/news/stemcell/primer.htm>
21. Гаворка Е. Плацента человека, 1970.
22. Цирельников Н. И. Гистофизиология плаценты, 1981.
23. Сапин М. Р., Билич Г. Л. Анатомия человека: учебник в 3 т. - изд. 3-е испр., доп. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. - Т. 2. - 496 с.
24. Применение экстракта плаценты.
25. C. Tarrade, E. Lecarpentier, S. Gil, O. Morel, N. Zahr, M. Dahirel, V. Tsatsaris, P. Chavatte-Palmer Analysis of placental vascularization in a pharmacological rabbit model of IUGR induced by l-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor  
*Pages 254-259*
26. Шаблий В.А., Г.С.Лобынцева, Кучма М.Д., Лобынцев Д.В. Получение мезенхимальных стволовых клеток (МСК) из криоконсервированной ткани плаценты.//Материалы III Международного симпозиума «Актуальные вопросы клеточных технологий».Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2010. Т.5, №3,. С.52-53.
27. Umbilical cord length in singleton gestations: A Finnish population-based retrospective register study *Pages 275-280* L. Georgiadis, L. Keski-Nisula, M. Harju, S. Räisänen, S. Georgiadis, M.-L. Hannila, S. Heinonen
28. Глуховец Б.И., Глуховец Н.Г. Патология последа. - СПб.: ГРААЛЬ, 2002. - 448 с.
29. Кузнецов С.Л. Лекции по гистологии, цитологии, эмбриологии. М.:Мед.информ.агентство, 2004.-427с.
30. The Official Journal of the International Federation of Placenta G.J. Burton, V. Clifton, Y. Sadovsky
31. Федорова Калашникова Е.П. Плацента и ее роль при беременности.- М.:Медицина,1986.-252 с.

32. Экстраэмбриональные и околоплодные структуры при нормальной и осложненной беременности: Коллективная моногр/ Под ред. В.Е.Радзинского, А.П. Милованова. - М.: МИА, 2004. - 393 с.
33. Пуповина как самостоятельный элемент в системе мать-плацента-плод, Л.В. Абдул-Оглы, Т.В. Стрижельчик, В.В. Кошарный, Н.В. Масич, Н.В. Пунтусова. [rusnauka.com](http://rusnauka.com)
34. Стволовые клетки и их медицинское значение. Национальный медицинский университет имени С.Ж.Асфендиярова. Кафедра молекулярной биологии и генетики.
35. Bone marrow cells play only a very minor role in chronic liver regeneration induced by a choline-deficient, ethionine-supplemented diet. Joanne N. Tonkin, Belinda Knight, David Curtis, Lawrence J. Abraham, George C.T. Yeoh *Pages 195-204*
36. Stem cell decision making and critical-like exploratory networks. Julianne D. Halley, Frank R. Burden, David A. Winkler. *Pages 165-177*
37. Восстановительная терапия будущего. Академик РАМН В. Смирнов
38. Один из полезных источников информации – сайт Национальных институтов здоровья США (National Institutes of Health (NIH), USA) (<http://stemcells.nih.gov/info/health.asp>).
39. Сохранение пуповинной крови: зачем и как. <http://medportal.ru>
40. Пуповинная кровь: перспективы применения стволовых клеток  
*В.И. Цымбалюк, член-корреспондент АМН Украины, д.м.н., профессор;  
Н.Я. Жилка, к.м.н.; В.П. Кидонь; Н.М. Баханцова* <http://health-ua.com>
41. Cord blood stem cells: current uses and future challenges. 19 Dec 2012. [eurostemcell.org](http://eurostemcell.org)
42. Umbilical Cord Issues/Delayed Cord Clamping, [gentlebirth.org](http://gentlebirth.org)
43. Hal E. Broxmeyer PhD and Franklin O. Smith MD (2009). "Cord Blood Hematopoietic Cell Transplantation.". *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation, Fourth Edition (Fourth Edition)*.
44. Raymer, Elizabeth (2005-10-14). "New strategy will boost cord blood stem cells". *University of Toronto*. Archived from the original on September 19, 2006. Retrieved September 20, 2006.
45. Yong Zhao, Theodore Mazzone (December 2010). "Human cord blood stem cells and the journey to a cure for type 1 diabetes."

46. Cairo MS, Wagner JE (1997). "Placental and/or umbilical cord blood: an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation." *Blood* **90** (12): 4665–4678.
47. Пуповинная кровь. trans-t.ru
48. Влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из плаценты, на регенерацию быстрообновляющихся тканей зрелых и старых лабораторных животных при воздействии экстремальных факторов тема диссертации и автореферата по ВАК 14.03.03, кандидат медицинских наук Маклакова, Ирина Юрьевна
49. Blau HM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? / HM Blau, TR Brazelton, JM Weimann // *Cell*. 2001.- № 105. - С. 829-841.
50. Bochkov N.P. Chromosome variability of human multipotent mesenchymal stromal cells / N.P. Bochkov, E.S. Voronina, N.V. Kosyakova // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2007. - Vol. 143(1). P. 122-126.
51. Burger S.R. Current regulatory issues in cell and tissue therapy / S. R. Burger // *Cytotherapy*. 2003. - Vol. 5, № 4. - P. 289 - 298.
52. Campagnoli C. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first trimester fetal blood, liver, and bone marrow / C. Campagnoli, I.A. Roberts, S. Kumar // *Blood*. 2001. - Vol. 98. - P.2396-2402.
53. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells as trophic mediators / A.I. Caplan, J.E. Dennis // *J. Cell Biochem*. 2006. - Vol. 98. - P. 1076-84.
54. Castro-Malaspina H. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny H. Castro-Malaspina, Gay R.E., Resnick G. // *Blood*. 1980. Vol. 56 P. 289-301.
55. Chang C.M. Placenta-derived multipotent stem cells induced to differentiate into insulin-positive cells / C.M. Chang, C.L. Kao, Y.L. Chang // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2007. - Vol. 357, № 2. - P. 414-420.
56. Dominici K. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells / K. Dominici, Le Blanc K., Mueller I. // *The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy* 2006. Vol. 8(4). - P. 315-317.
57. Eto N. Eluctuation of the fibrosis markers with aging / N. Eto, Yoshino J., Inui K. // *Nippon Ronen Igakkai Zasshi*. 2002. - Vol. 39. - N 2. - P. 176-180.
58. Evans M.J. Establishment in culture of pluri-potential cells from mouse embryos / Evans M.J., M.H. Kaufman // *Nature*. -1981. Vol. 292. - P. 154-156.

59. Fisher J.W. Extremal messenger and erythropoietin production / J.W. Fisher, M. Kuno // *Annals N.Y.Acad.Sci.* 1999. - Vol. 554. - P. 9-20.
60. Portmann Lanz C.B. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration / C.B. Portmann Lanz, A. Schoeberlein, A. Huber // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2006. - Vol. 194. - P 664-73.
61. Rao M.S. Stem cell and aging: expanding the possibilities M.S. Rao, Mattson M.P. // *Mech. Ageing Dev.* 2001. - Vol. 122. - P. 713-734.
62. Reyes M. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells / M. Reyes, C.M. Verfaillie // *Ann NY AcadSci* 2001.-938. 231-3; discussion 233-5.
63. Rice C.M. Stem cells for the treatment of neurological disease / C.M. Rice, C.A. Halfpenny, NJ. Scolding // *Transfus. Med.* 2003. - Vol. 13, № 6. - P. 351-361.
64. Roisen F J. Adult human olfactory stem cells / F.J. Roisen, Klueber K.M., Lu C.L. // *Brain. Res.* 2001. - Vol. 890, - P. 11-22.
65. Romanov Y.A. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord / Y.A. Romanov, Svinitskaya V.A., Smimov V.N. // *Stem Cells.* 2003. - Vol. 21. -P.105-110.
66. Rubio D. Spontaneous human adult stem cells transformation / D. Rubio, Garcia-Castro J., Martin M.C // *Cancer Res.* 2005. - Vol. 65. - P. 3035.
67. Amniotic band syndrome By Luís Flávio Gonçalves, MD, Philippe Jeanty, MD, PhD. 1999-09-26-18
68. Histology Learning System: *19903loa* - "Female Reproductive System: placenta, chorionic plate"
69. Amniotic mesenchymal stem cells have robust angiogenic properties and are effective in treating hindlimb ischaemia Sung-Whan Kim Hong-Zhe Zhang, Chae Eun
70. Kim, Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M, et al Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol*2007;7:11. doi:10.1186/1471-213X-7-11.
71. stem-cells.su // СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ В ОФТАЛЬМОЛОГИИ
72. <http://eyeshelp.ru/articles/>
73. Enzmann V, Yolcu E, Kaplan HJ, Ildstad ST (2009) Stem cells as tools in regenerative therapy for retinal degeneration. *Arch Ophthalmol* 127:563–571
74. Lund RD, Kwan AS, Keegan DJ, Sauve Y, Coffey PJ, Lawrence

- JM (2001) Cell transplantation as a treatment for retinal disease. *Prog Retin Eye Res* 20:415–449
75. Djojosebroto MW, Arsenijevic Y (2008) Retinal stem cells: promising candidates for retina transplantation. *Cell Tissue Res*
76. Zwart I, Hill AJ, Al-Allaf F, Shah M, Girdlestone J, Sanusi AB, Mehmet H, Navarrete R, Navarrete C, Jen LS (2009) Umbilical cord blood mesenchymal stromal cells are neuroprotective and promote regeneration in a rat optic tract model. *Exp Neurol* 216:439–448
77. Zwart I, Hill AJ, Al-Allaf F, Shah M, Girdlestone J, Sanusi AB, Mehmet H, Navarrete R, Navarrete C, Jen LS (2009) Umbilical cord blood mesenchymal stromal cells are neuroprotective and promote regeneration in a rat optic tract model. *Exp Neurol* 216:439–448
78. Lund RD, Wang S, Klimanskaya I, Holmes T, Ramos-Kelsey R, Lu B, Girman S, Bischoff N, Sauve Y, Lanza R (2006) Human embryonic stem cell-derived cells rescue visual function in dystrophic RCS rats. *Cloning Stem Cells* 8:189–199
79. Lund RD, Wang S, Lu B, Girman S, Holmes T, Sauve Y, Messina DJ, Harris IR, Kihm AJ, Harmon AM, Chin FY, Gosiewska A, Mistry SK (2007) Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease. *Stem Cells* 25:602–11
75. Chaudhry GR, Fecek C, Lai MM *et al.* Fate of embryonic stem cell derivatives implanted into the vitreous of a slow retinal degenerative mouse model. *Stem Cells Dev.* 18(2),247–258 (2009). [CrossRef] [CAS]
76. Li Y, Zhong X, Yan J *et al.* Pluripotent embryonic stem cells developed into medulloepithelioma in nude mice eyes. *Yan Ke Xue Bao* 18(1),37–44 (2002).
77. Arnhold S, Klein H, Semkova I, Addicks K, Schraermeyer U. Neurally selected embryonic stem cells induce tumor formation after long-term survival following engraftment into the subretinal space. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45(12),4251–4255 (2004).[CrossRef] [Medline]
78. Van Der Bogt KE, Swijnenburg Rj, Cao F, Wu JC. Molecular imaging of human embryonic stem cells: keeping an eye on differentiation, tumorigenicity and immunogenicity. *Cell Cycle* 5(23),2748–2752 (2006). [CrossRef] [Medline] [CAS]
79. US FDA Cellular, Tissue and Gene Therapies Advisory Committee. *Cellular and Gene Therapies for Retinal Disorders (CTGTAC Meeting #52)*. Cellular, Tissue and Gene Therapies Advisory Committee, FDA, USA (2011).



80. Robinton DA, Daley GQ. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* 481(7381), 295–305 (2012).
81. ■ Recent review covering various aspects of the induced pluripotent stem cell technology, including an up-to-date summary of different methods of induced pluripotent stem cell derivation and their application in disease modeling. [CrossRef] [Medline] [CAS]
82. Stem cells: scientific progress and future research directions. Издание National institutes of health, USA. Июнь, 2001.
83. <sup>[2]</sup> Трансплантация фетальных тканей и клеток. Сб. науч. ст. / Под ред. В. И. Кулакова, Г. Т. Сухих. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. -1998. - Т. 126., Приложение I.
84. <sup>[3]</sup> Huard JM, Youngentob SL, Goldstein BJ, Luskin MB & Schwob, JE. (1995) Adult olfactory epithelium contains multipotent progenitors that give rise to neurons and non-neural cells. *J Comp Neurol* 400, 469-86.
85. <sup>[4]</sup> Barnett S., Do olfactory ensheathing cells have stem-cell-like properties? Текст статьи доступен в сети Интернет по адресу: <http://www.medicine.gla.ac.uk/studentships/Projects/Barnett.htm>
86. <sup>[5]</sup> Patricia A. Zuk, Min Zhu et al. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. : *Tissue Engineering V. 7 N. 2 Pp. 211 – 228.* Текст статьи доступен в сети Интернет по адресу: <http://susanna.catchword.com/vl=7138656/cl=5/nw=1/rpsv/catchword/mal/10763279/v7n2/s11/p211>
87. <sup>[6]</sup> К. М. Абдулкадыров, Н. А. Романенко, Н. Н. Старков. Получение и клиническое применение периферических гемопоэтических стволовых клеток из пуповинной крови. Обзор литературы и собственные данные. Текст статьи доступен в сети Интернет по адресу: [http://www.armed.ru/articles/romanenko\\_2.htm](http://www.armed.ru/articles/romanenko_2.htm)
88. <sup>[7]</sup> Company Finds Stem Cell Source in Placentas. Reuters Health, Thursday April 12 5:32 PM ET. Текст статьи доступен в сети Интернет по адресу <http://www.anthroogenesis.com/page411559.htm>
89. <sup>[8]</sup> Placentas Said To Offer Stem Cells. Associated Press, Wednesday April 11 5:42 PM ET Текст статьи доступен в сети Интернет по адресу <http://www.anthroogenesis.com/page411559.htm>
90. Ballios et al. A hydrogel-based stem cell delivery system to treat retinal neurodegenerative disease. *Biomaterials*. 2010; 31: 2555-2564.]

91. Bull N, & Martin, K. Concise Review: Toward Stem Cell-Based Therapy for Retinal Neurodegenerative Diseases. *Stem Cells* 2011;29:1170-1175.
92. Emerich DF, Thanos CG. NT-501: An ophthalmic implant of polymer encapsulated ciliary neurotrophic factor-producing cells. *Curr Mol Ther* 2008; 10:506-515.
93. Harrison's Principles of Internal Medicine. 18<sup>th</sup> Edn. /editors. Dan L. Longo et al. The McGraw-Hill Companies, Inc. 2012.]
94. Rama P. et al. Limbal stem cell therapy and long-term corneal regeneration. *New England Journal of Medicine*. 2010;36(2):147-155.
95. Schwartz S et al. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *The Lancet* 2012;379:713-720.
96. Tibbetts et al. Stem cell therapy for retinal disease. *Current Opinion in Ophthalmology*. 2012;23(3):226-234.
97. Timoyouki Inoie et al. Maximizing Functional Photoreceptor Differentiation from Adult Human Retinal Stem Cells. *Stem Cells*. 2010;28(3):489-500.
98. Tropepe et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science*. 2000 Mar 17;287(5460):2032-6.
99. Wallace V. Concise Review: Making a Retina – From the Building Blocks to Clinical Applications. *Stem Cells* 2011;29:412-417.
100. Wing, YY et al. Progenitors for the Corneal Endothelium and Trabecular Meshwork: A Potential Source for Personalized Stem Cell Therapy in Corneal Endothelial Diseases and Glaucoma. *J Biomed Biotechn*. 2011; 2011:412743.
101. Гундорова Р.А., Ченцова Е.В. Клеточные технологии в офтальмологии: 10-летний опыт экспериментальных исследований и перспективы в клинике // Российский офтальмологический журнал. – 2008. – Т. 1. – № 1. – С. 45–49.
102. Пальцева М.А., Смирнова В.Н. Терапевтический потенциал клеток пуповинной крови при негематологических заболеваниях. – М., 2011. – 176 с.
103. Смолянинов А.Б., Хурцилава О.Г., Тыренко В.В. с соавт. Современная стратегия регенеративной терапии и безопасность применения аллогенных стволовых клеток пуповинной крови при нейродегенеративных заболеваниях // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. 4. – № 4. – С. 14–20.
104. Тахчиди Х.П., Гаврилова Н.А., Комова О.Ю. с соавт. Влияние стволовых/прогениторных клеток на функциональное состояние и степень выраженности дегенеративных изменений сетчатки у крыс линии Campbell // Офтальмохирургия. – 2010. – № 3. – С. 33–38.
105. Ченцова Е.В., Пак Н.В., Зуева М.В. с соавт. Влияние трансплантации нейральных стволовых клеток на процессы регенерации сетчатки в

- эксперименте // Российский офтальмологический журнал. – 2012. – Т. 5. – № 4. – С. 83–88.
106. Амниотическая жидкость – новый источник стволовых клеток.  
<http://cbio.ru>
107. Разработан способ восстановления сетчатки с помощью стволовых клеток. <http://cbio.ru> Оригинальная статья: T. S. Park, I. Bhutto, L. Zimmerlin, J. S. Huo, P. Nagaria, D. Miller, A. J. Rufaihah, C. Talbot, J. Aguilar, R. Grebe, C. Merges, R. Reijo-Pera, R. A. Feldman, F. Rassool, J. Cooke, G. Lutty, E. T. Zambidis. Vascular Progenitors from Cord Blood-Derived iPSC Possess Augmented Capacity for Regenerating Ischemic Retinal Vasculature. *Circulation*, 2013;
108. Способ лечения атрофии зрительного нерва сосудистого генеза.  
[findpatent.ru](http://findpatent.ru)
109. Механизм получения стволовых клеток, проблемы и перспективы использования их в медицине. <http://bibliofond.ru>
110. Контактные линзы + стволовые клетки – новый метод быстрого восстановления зрения. <http://zreni.ru>
111. Лечение ожогов глаз стволовыми клетками. <http://biostem.com.ua>
112. Способ лечения ожогов глаза. [findpatent.ru](http://findpatent.ru)
113. [www.nomoredarkness.com](http://www.nomoredarkness.com)
114. <http://www.semmissourian.com/story/1252605.html>
115. Морозов В.И., А.А. Яковлев . Рациональная фармакотерапия в офтальмологии // под ред. Е.А. Егорова. М.: Литтера. 2006. С.652-657; // Фармакотерапия глазных болезней. М.: МЕДпресс-информ. 2009. С.169-179
116. кандидат медицинских наук Маклакова, Ирина Юрьевна .Влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из плаценты, на регенерацию быстрообновляющихся тканей зрелых и старых лабораторных животных при воздействии экстремальных факторов.

## DECLARATIE

Prin prezenta declar ca Lucrarea de licenta cu titlul : “ Celule stem a complexului ombilico-placentar în tratamentul maladiilor oculare.” este scrisa de mine si nu a mai fost prezentata niciodata la o alta facultate sau institutie de invatamint superior din tara sau strainatate. De asemenea, ca toate sursele utilizate, inclusiv cele de pe internet, sunt indicate in lucrare, cu respectarea regulilor de evitare a plagiatului:

- toate fragmentele de text reproduse exact, chiar si in traducere proprie din alta limba, sunt scrise intre ghilimele si detin referinta precisa a sursei;
- reformularea in cuvinte proprii a textelor scrise de catre alti autori detine referinta precisa;
- rezumarea ideilor altor autori detine referinta precisa la textul original.

Data 16.04.2014

Absolvent Prenume Nume

Focsa Stanislav

(semnatura in original)