

**Трансплантация стволовых клеток  
в лечении различных заболеваний  
6 курс**

**профессор Моисеев С.И.**

- **Хронический миелолейкоз – 40-80%**
- **Острый нелимфобластный лейкоз - 40-70%**
- **Острый лимфобластный лейкоз - 40-80%**
- **Апластическая анемия - 50-80%**  
**(анемия Фанкони) - 70%**
- **Талассемия - 70%**
- **Множественная миелома - 10-30%**
- **Злокачественные лимфомы (III-IV) - 40-70%**
- **Миелодиспластический синдром - 40-86%**
- **Врожденные иммунодефициты и ферментопатии - 80%**

# Ближайшие перспективы применения стволовых клеток

- Рассеянный склероз
- Болезнь Паркинсона
- Повреждение головного и спинного мозга
- Инсульт
- Болезнь Альцгеймера
- Диабет

# Этапы развития науки о стволовых клетках и клеточной терапии

- **1908** Александр Максимов предлагает концепцию стволовой клетки для системы кроветворения.
- **1953** Показано, что трансплантация костного мозга может спасти животных, получивших смертельную дозу радиации.
- **1960-е** первые попытки пересадки аллогенного костного мозга больным лейкемией

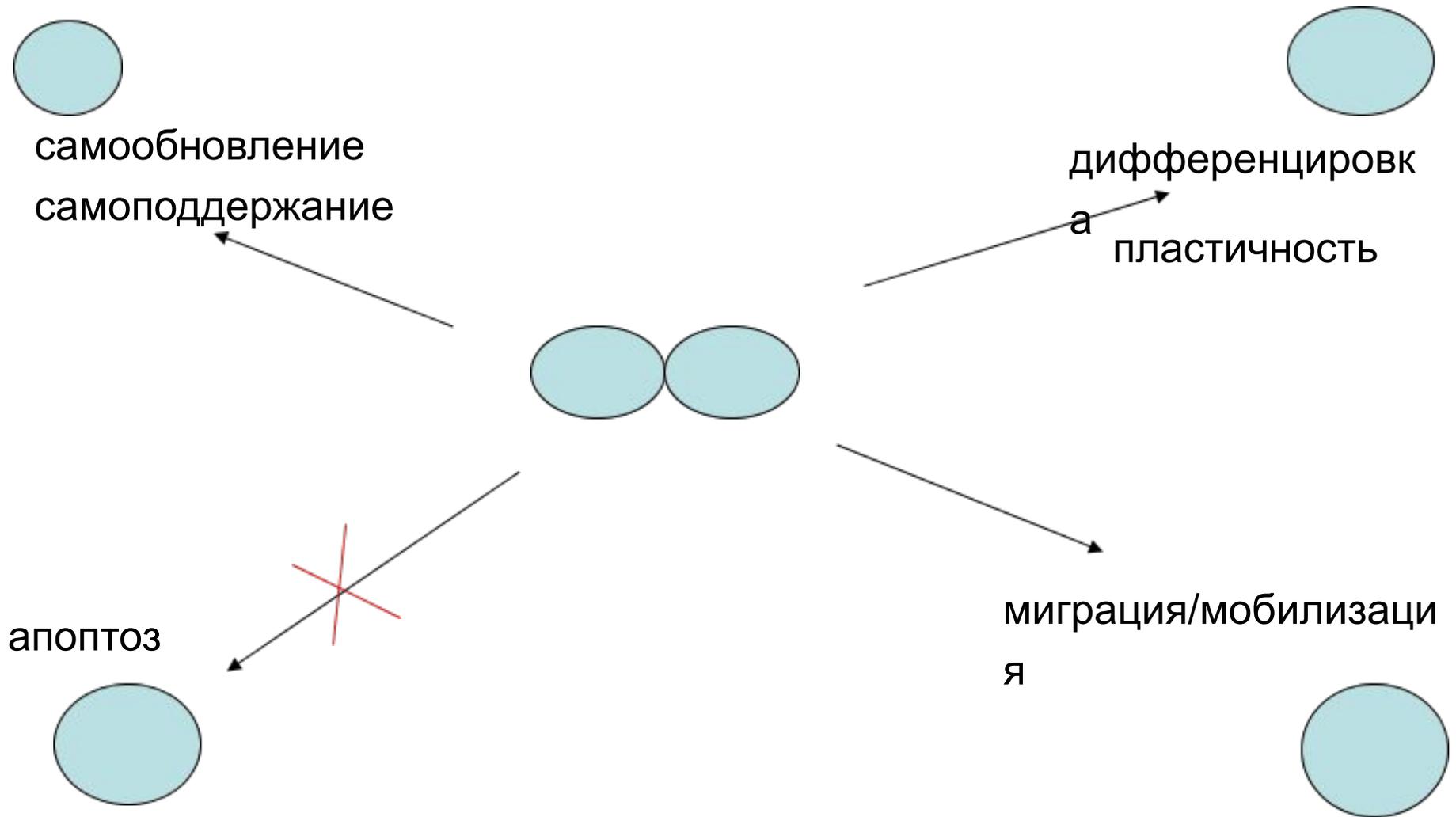
- **1970-е** Первая аутологичная трансплантация костного мозга больному лимфомой
- **1980-е** Первая трансплантация стволовых клеток, полученных из периферической крови методом афереза
- **1988** Э. Глюкман в клинике Святого Людвига в Париже провела первую операцию по трансплантации пуповинной крови ребенку с анемией Фанкони.
- **1990** Б. Д. Томас впервые осуществил

- 2000-е - дифференцированное применение различных видов стволовых клеток (гемопоэтических, мезенхимных, предшественников эндотелиоцитов/ангиобластов);  
использование генотерапии

Стволовые клетки – клетки, способные к самообновлению (самоподдержанию) и дифференцировке в один или более типов зрелых клеток

E. Herzog et al. Blood, 2003, 102, 3483-3493

# Стволовые клетки – функции и жизнедеятельность





**Тотипотентные стволовые  
клетки**

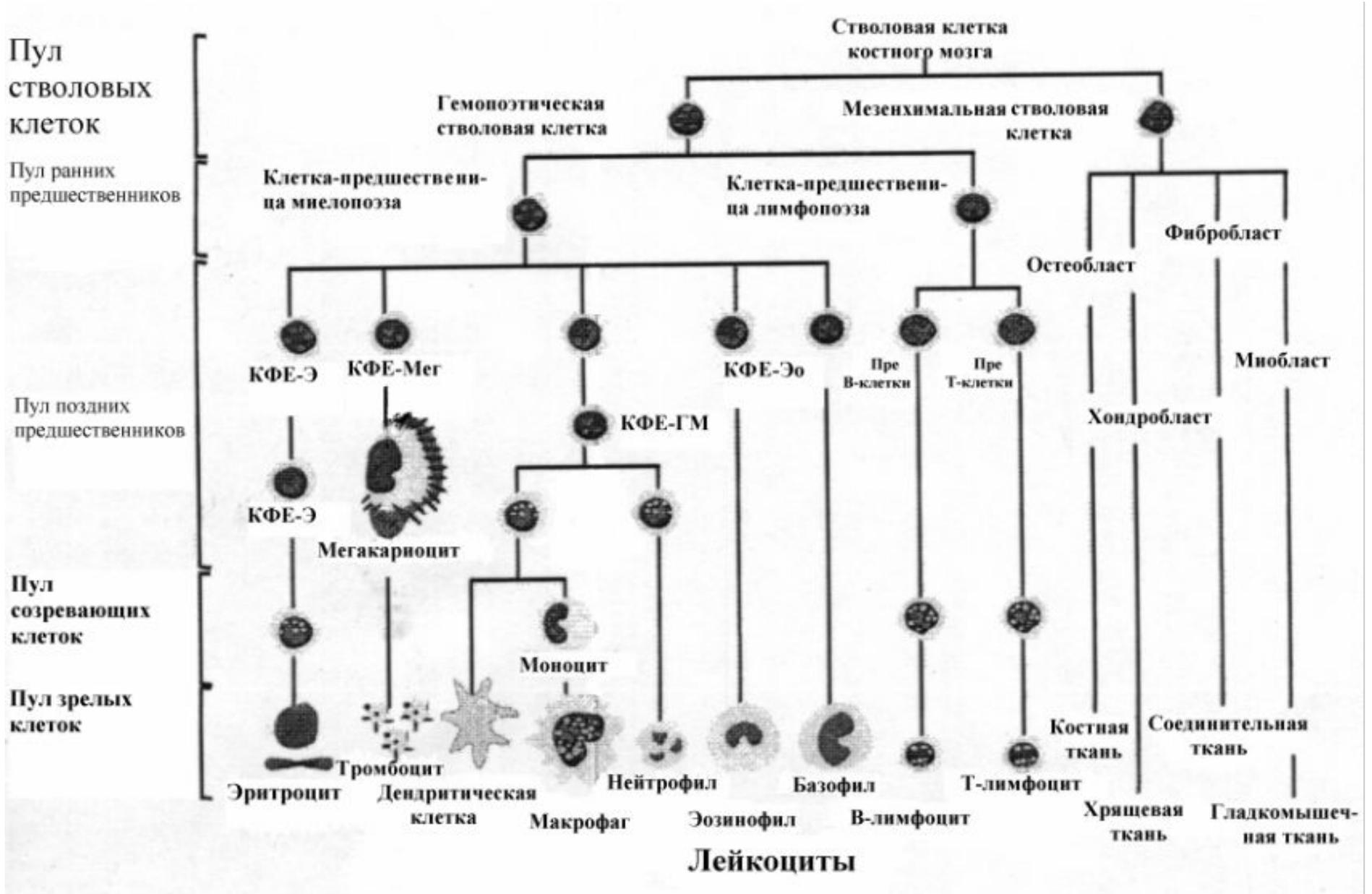
● **Плюрипотентные стволовые  
клетки**

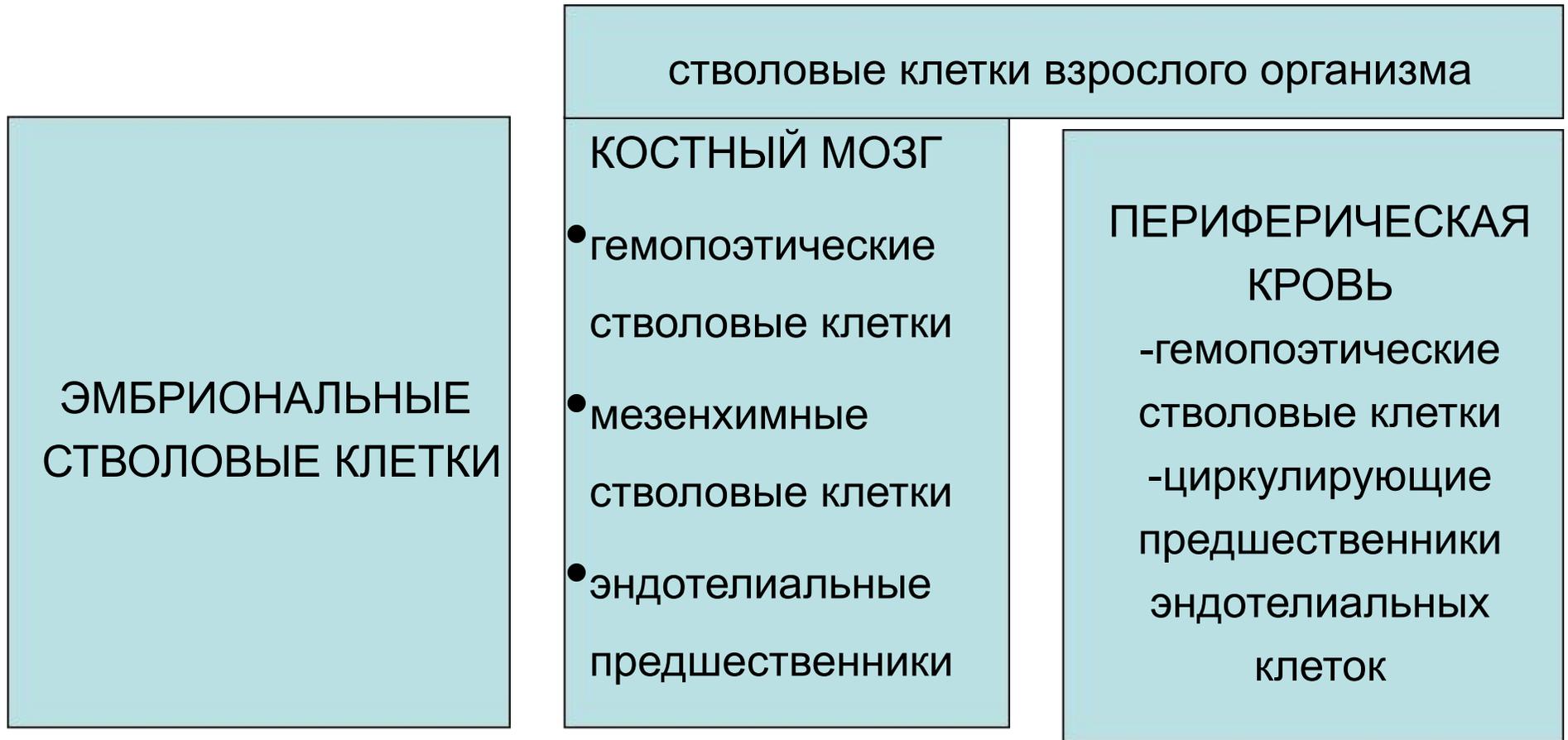
● **Полипотентные стволовые  
клетки**

# ***Тотипотентные стволовые клетки***

- **источник – бластоциста, которая формируется к 5 дню оплодотворения**
- **способны дифференцироваться во все типы клеток тканей организма:**
  - клетки тканей эмбриона
  - клетки экстраэмбриональные (плацента)
  - клетки тканей новорожденного
  - клетки тканей взрослого человека**( высокая пластичность )**
- ***получены и зарегистрированы***

# Общая схема кроветворения





жировая ткань - МСК

пуповинная кровь

ткани эмбриона  
(10-12 недель)

# В клинической практике используются:

- Неселективные СК КМ
- Неселективные СК ПК (мобилизация СК ростовыми факторами)
- Селективные СК КМ ( ГСК, МСК, ЭП)
- Селективные СК ПК (ГСК, МСК, ЭП)
- Мезенхимные стволовые клетки

# Иммунофенотип стволовых клеток. Иммуноселекция

- Гемопоэтические стволовые клетки  
(CD133+, CD34+, CD45+ )
- Мезенхимные стволовые клетки  
( CD105+, CD45-; CD29+, CD45-, CD34-;)
- Мезенхимные стволовые  
клетки/ангиобласты ( CD106+)

# Дифференцировка стволовых клеток

Тип стволовых клеток (источник)	Тип формирующейся ткани	In vivo	In vitro
ГСК Костный мозг	кровь	+	+
ГСК Костный мозг	мышечная	+	+
ГСК Костный мозг	Нервная (нейроны, макроглии, нейроны Пуркинье, астроциты)	+	+
ГСК Костный мозг	Печень (гепатоциты, холангиоциты)	+	+
ГСК Костный мозг	кардиомиоциты	+	+
ГСК Костный мозг	легкие	+	-
ГСК Костный мозг	почки	+	-
ГСК Костный мозг	кожа	+	-
ГСК Костный мозг	Эпителий кишечника	+	-
ГСК Костный мозг	Эндотелий, гладкомышечные клетки	+	-

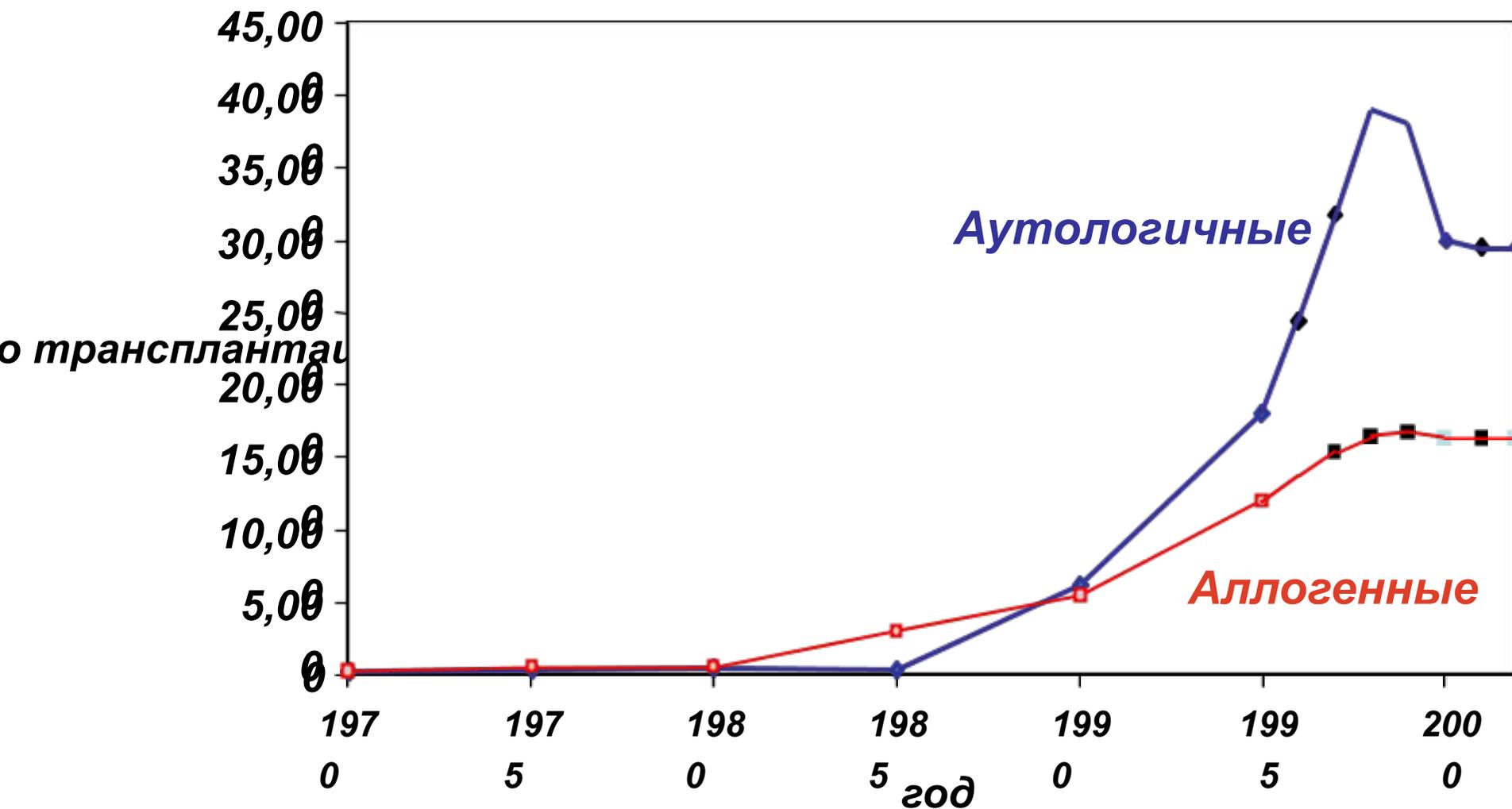
# Дифференцировка стволовых клеток

Тип стволовых клеток (источник)	Тип формирующейся ткани	In vivo	In vitro
ГСК ПК	кровь	+	+
ГСК ПК	кардиомиоциты	+	+
ГСК ПК	Нервная	+	+
ГСК ПК	печень	+	+
ГСК ПК	кардиомиоциты	+	+
ГСК ПК	легкие	+	-
ГСК ПК	почки	+	-
ГСК ПК	кожа	+	-
ГСК ПК	Эпителий кишечника	+	-

## Дифференцировка стволовых клеток

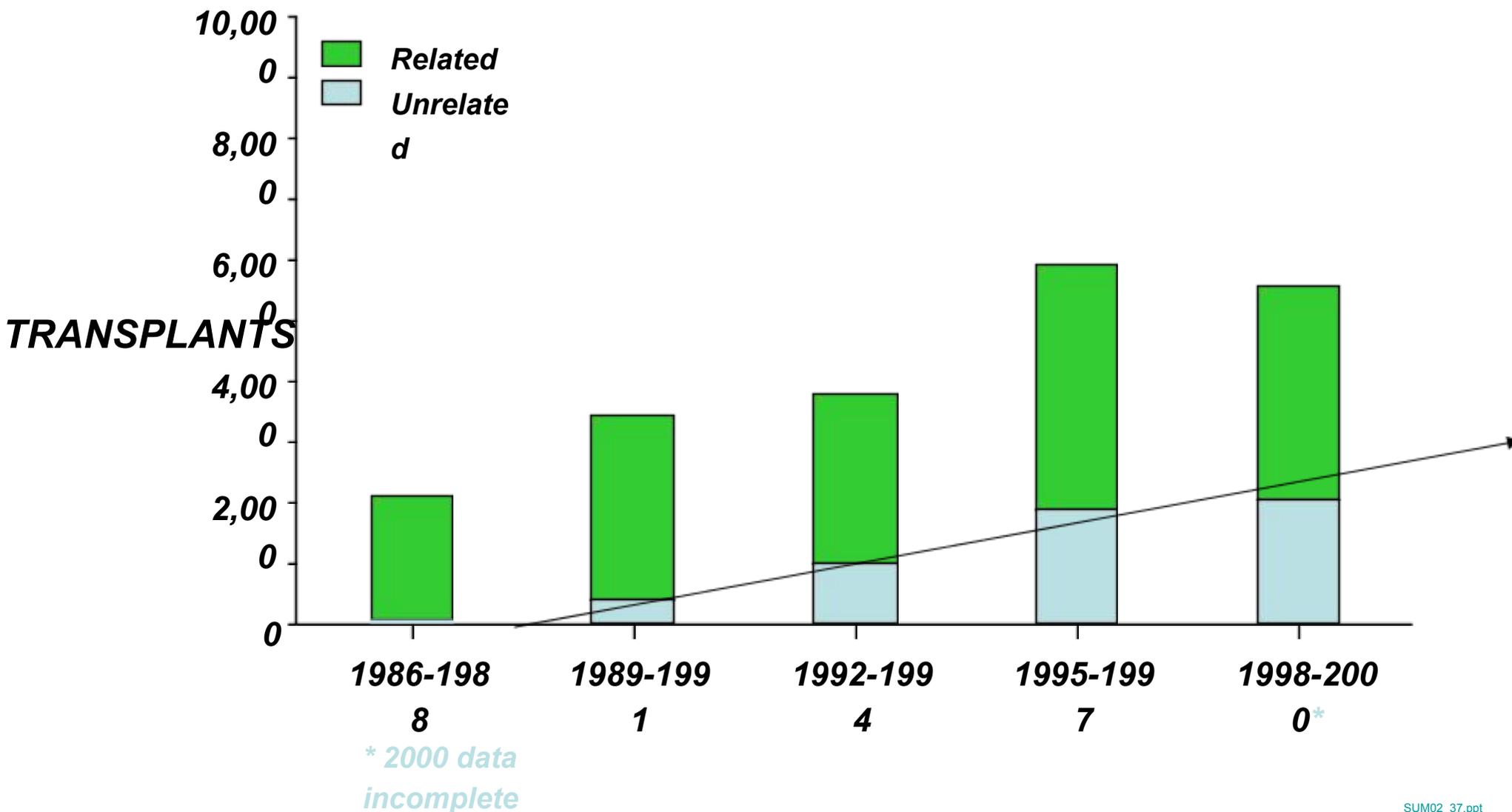
Тип стволовых клеток (источник)	Тип формирующейся ткани	In vivo	In vitro
Мезенхимные стволовые клетки (МСК)	кровь	+	+
(МСК)	остеобласты	+	+
(МСК)	хондробласты	+	+
(МСК)	адипоциты	+	+
(МСК)	миоциты	+	+
(МСК)	легкие	+	-
(МСК)	Нервная ткань	+	-
(МСК)	кожа	+	-
(МСК)	Эпителий кишечника	+	-
(МСК)	Эндотелий, гладкомышечные клетки	+	-

# Количество трансплантаций гемопоэтических стволовых клеток в мире в 1970-2002 годы (IBMTR, 2003)



<p><b>1). ТРАНСПЛАНТАЦИЯ АЛЛОГЕННЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Трансплантация аллогенного костного мозга</li> <li>- Трансплантация аллогенных периферических стволовых клеток</li> <li>- Трансплантация клеток пуповинной крови</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>HLA-совместимых от донора-родственника</b></li> <li>- <b>HLA-частично-совместимых от донора-родственника</b></li> <li>- <b>HLA-совместимых от неродственного донора</b></li> <li>- <b>HLA-частично-совместимых от неродственного донора</b></li> </ul>
<p><b>2). ТРАНСПЛАНТАЦИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Трансплантация аутологичного костного мозга</li> <li>- Трансплантация аутологичных периферических стволовых клеток</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>С ОЧИСТКОЙ</b></li> <li>- <b>БЕЗ ОЧИСТКИ</b></li> </ul>
<p><b>3). ТРАНСПЛАНТАЦИЯ СИГЕННЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК</b></p>	
<p><b>4).” МИНИ”- ТРАНСПЛАНТАЦИЯ</b></p>	
<p><b>5). ТРАНСПЛАНТАЦИЯ EX VIVO МОДИФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК</b></p>	

# Количество родственных и неродственных аллогенных трансплантаций больным в возрасте до 20 лет по данным IBMTR, 1986-2000



**Трансплантация ex vivo модифицированных клеток находит клиническое применение при решении следующих задач:**

- **культивирование аутологичных стволовых клеток для снижения контаминации опухолевыми клетками. Чаще проводят у больных с солидными опухолями, но возможно и у больных гемобластозами при использовании культуральной системы с нормальной подложкой;**
- **наращивание количества стволовых клеток при невозможности заготовки их достаточного количества и при выполнении двойной трансплантации стволовых клеток; наращивание стволовых клеток пуповинной крови для трансплантации взрослым больным (вес > 40 кг);**
- **проведение генной терапии**

Трансплантация аллогенных стволовых клеток используется для

- Замещения дефектного гемопоэза после высокодозной химио/лучевой терапии онкогематологических заболеваний
- Замещения дефектного гемопоэза при наследственных заболеваниях с нарушением гемопоэза и иммунитета
- Проведения клеточной терапии (иммунотерапии) химиорезистентных опухолей

# Методология аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

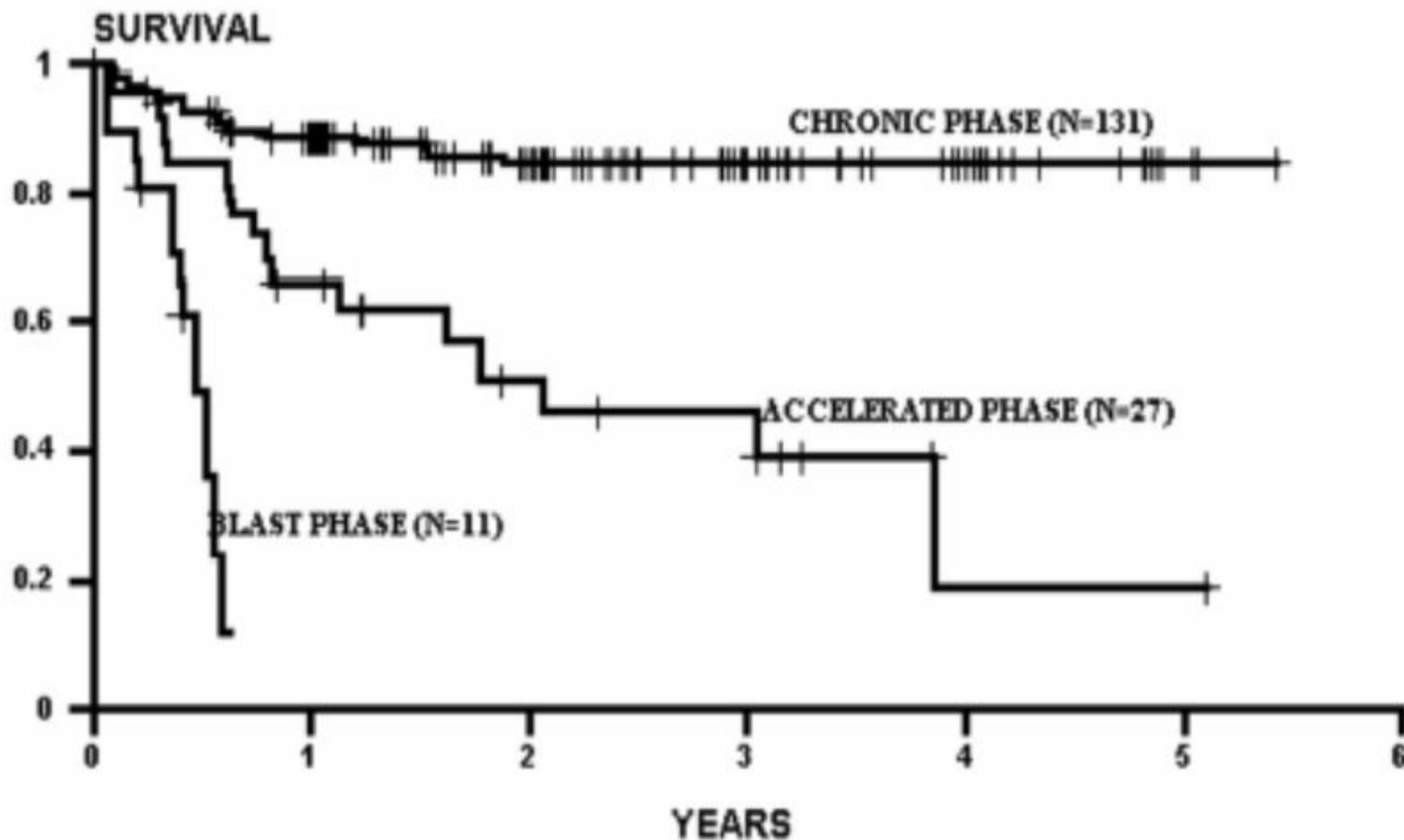
**Основные этапы выполнения аллогенной трансплантации стволовых клеток крови или костного мозга :**

- **предтрансплантационная подготовка больного,**
- **подбор/поиск HLA совместимого донора,**
- **кондиционирование к трансплантации,**
- **заготовка стволовых клеток крови (оценка количественной и качественной полноценности трансплантата),**
- **инфузия/трансплантация стволовых клеток,**
- **иммуносупрессивная терапия (профилактика отторжения трансплантата и реакции трансплантат против хозяина)**

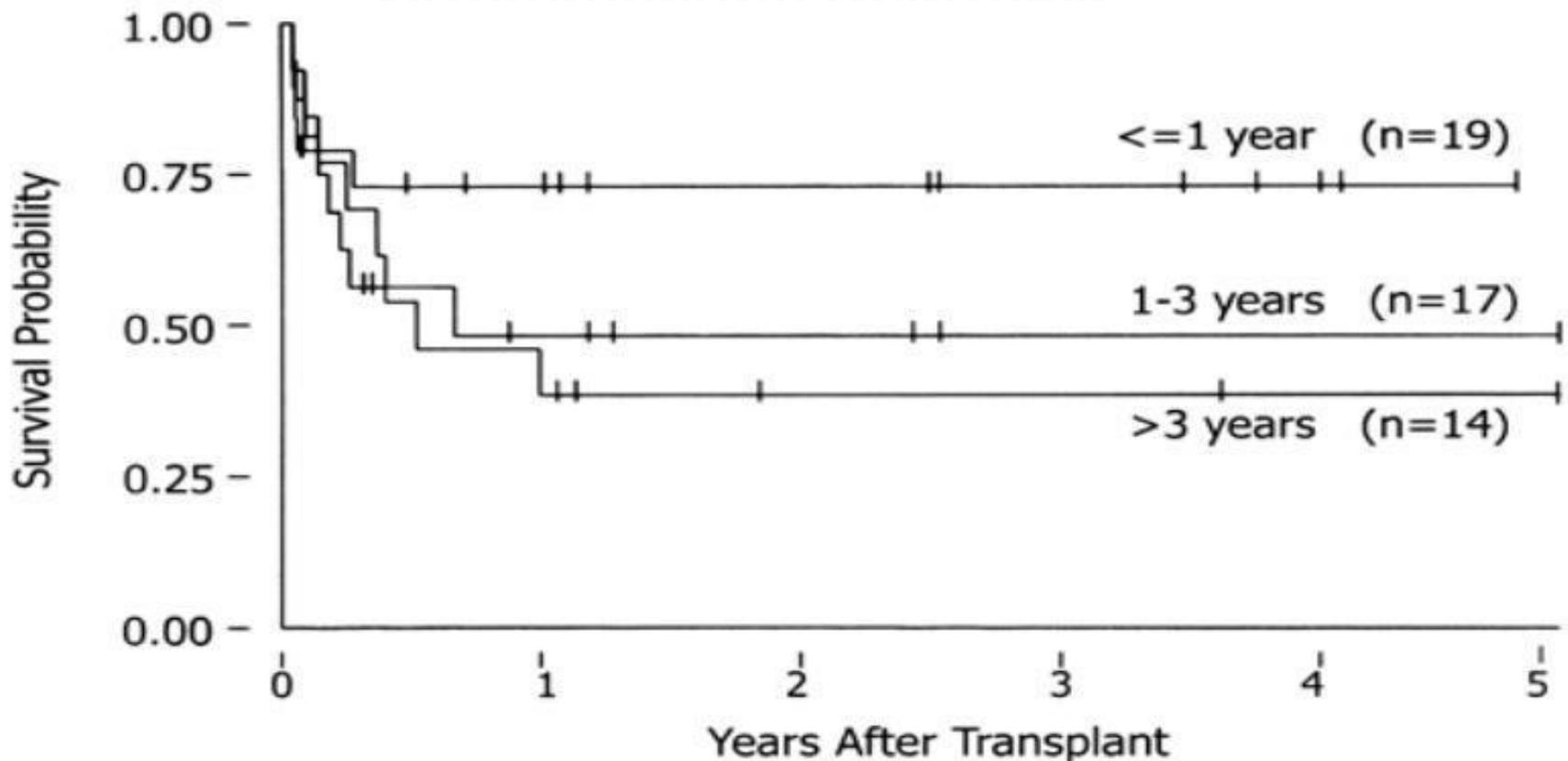
# Предтрансплантационная подготовка больного к аллогенной трансплантации стволовых клеток

- **Достижение полной клинико-гематологической ремиссии при острых лейкозах**
- **Достижение полного или частичного гематологического ответа у больных хроническим миелолейкозом в хронической фазе, достижение второй хронической фазы у больных с бластным кризом или фазой акселерации**
- **Профилактика сенсibilизации и цитомегаловирусной инфекции при проведении гемокомпонентной терапии**

**Общая выживаемость больных ХМЛ после аллогенной трансплантации костного мозга в зависимости от стадии заболевания (В.Ж.Друкер е.а.,2002)**



# Эффективность аллогенной трансплантации стволовых клеток при апластической анемии в зависимости от сроков ее выполнения с момента установления диагноза



(From Deeg HJ, Amylon MD, Harris RE, et al: Marrow transplants from unrelated donors for patients with aplastic anemia: Minimum effective dose of total body irradiation. Biol Blood Marrow Transplant 7:208-215, 2001.)

# Подбор/поиск HLA-совместимого донора

<b>Этапность подбора донора</b>	<b>Этапность обследования</b>
<ol style="list-style-type: none"><li>1. HLA-совместимый сиблинг или донор-родственник</li><li>2. HLA-совместимый неродственный донор (запрос в донорский регистр)</li><li>3. HLA-частично-совместимый родственный или неродственный донор</li></ol>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Допуск в соответствии с инструкциями для доноров крови (&gt;18 &lt;60 лет)</li><li>2. HLA типирование по локусам A,B, DR</li><li>3. исследование на носительство вирусов (вирус иммунодефицита 1 и 2 типа, человеческий Т-лимфотропный вирус, вирус гепатита В, гепатита С, ЦМВ и др).</li><li>4. определение больших и малых эритроцитарных</li></ol>

# Заготовка клеток пуповинной крови

- не менее  $3 \times 10^7$ /кг веса больного мононуклеарных клеток,
- не менее  $1,2 \times 10^5$ /кг веса больного CD34+ клеток

Эффективность заготовки стволовых  
клеток – 80%

Обязательным компонентом трансплантации аллогенных гемопоэтических клеток является проведение химиолучевой подготовки или **кондиционирования** больного к трансплантации, обеспечивающего эрадикацию измененного гемопоэза и приживление донорских стволовых клеток.

# ОСНОВНЫЕ МИЕЛОАБЛАТИВНЫЕ РЕЖИМЫ КОНДИЦИОНИРОВАНИЯ

## БУСУЛЬФАН + ЦИКЛОФОСФАМИД

- БУСУЛЬФАН 4 мг/кг дни - 7, - 6, - 5, - 4
- ЦИКЛОФОСФАМИД 60 мг/кг дни - 3, - 2

## БУСУЛЬФАН + ЦИКЛОФОСФАМИД + VP-16

- БУСУЛЬФАН 4 мг/кг дни - 10, - 9, - 8, - 7
- ЦИКЛОФОСФАМИД 50 мг/кг дни - 5, - 4, - 3
- VP-16 10 мг/кг дни - 6, - 5, - 4

## ЦИКЛОФОСФАМИД + ТОТ

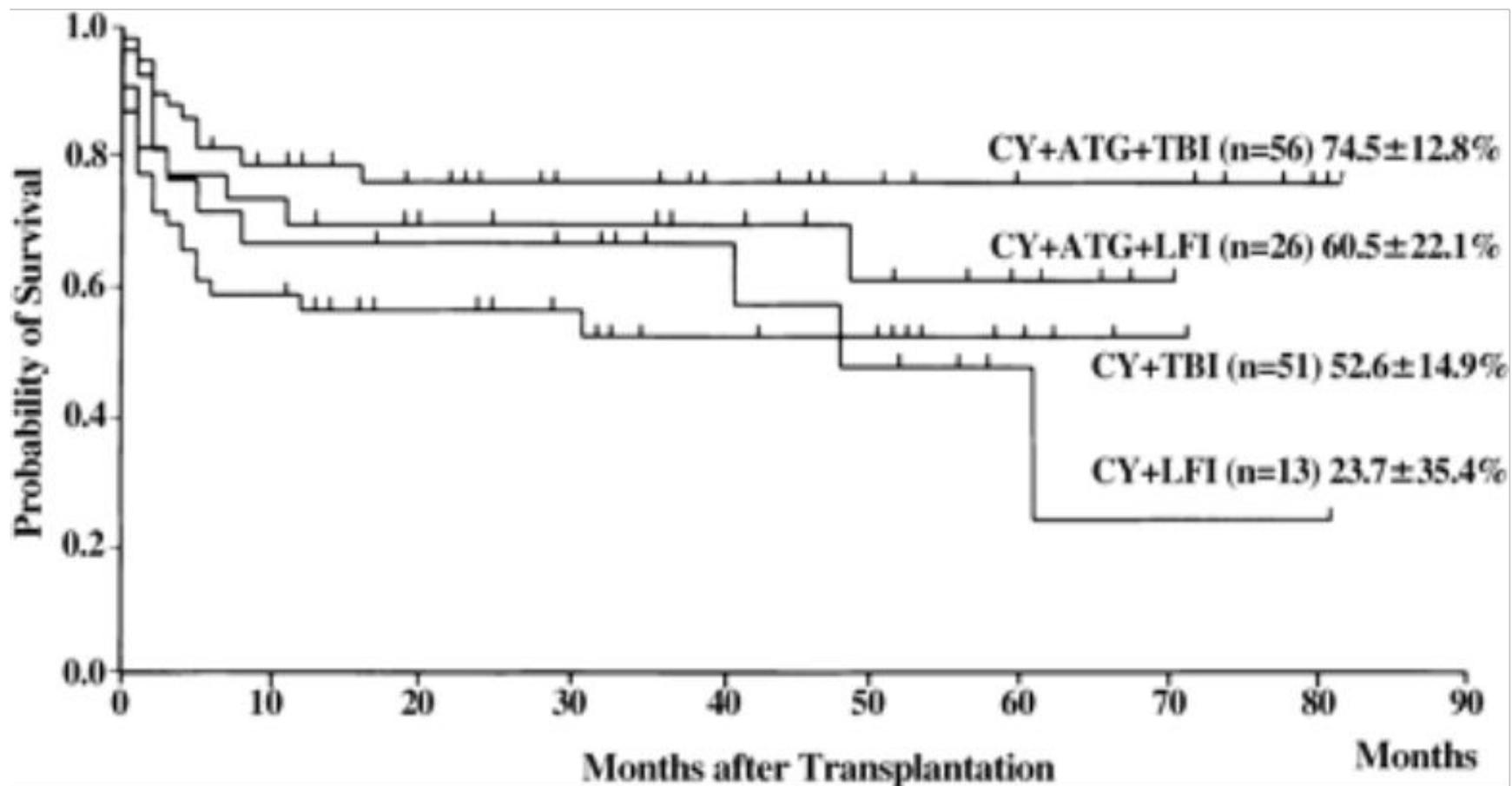
- ЦИКЛОФОСФАМИД 60 мг/кг дни - 6, - 5
- ТОТ 22,4 Гр x 2 день - 3, - 2, - 1

# НЕМИЕЛОАБЛАТИВНЫЙ РЕЖИМ КОНДИЦИОНИРОВАНИЯ К ТРАНСПЛАНТАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КРОВИ И КОСТНОГО МОЗГА

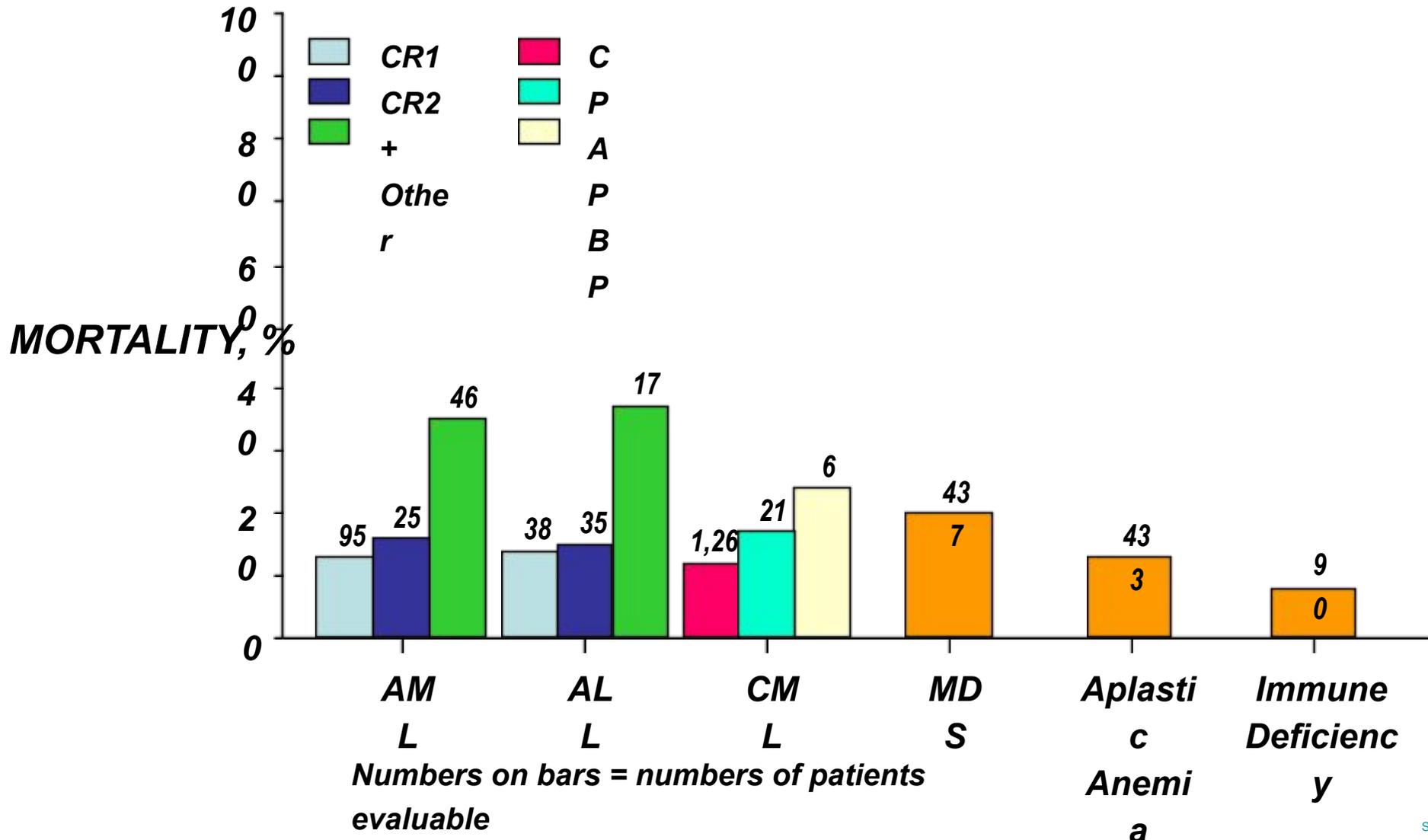
## ФЛУДАРАБИН + БУСУЛЬФАН + АЛГ

- ФЛУДАРАБИН	30 мг/м <sup>2</sup> дни	-10 - -5
- БУСУЛЬФАН	4 мг/кг дни	-6 --5
- АЛГ	10 мг/кг дни	-4 - -1

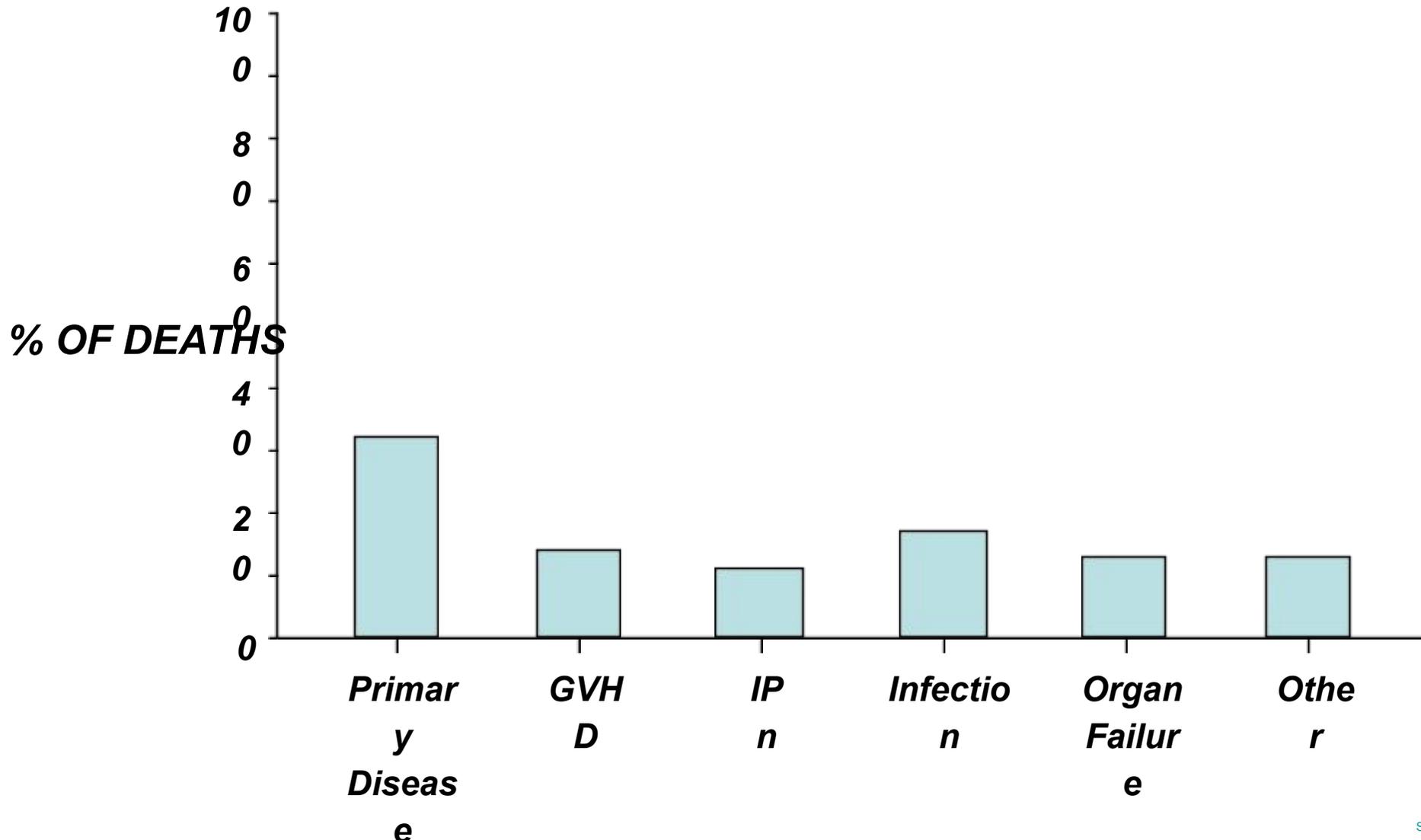
# Общая выживаемость больных апластической анемией после неродственной и родственной частично-совместимой по системе HLA ТСК



# Ранняя смертность (100 дней) после аллогенной трансплантации стволовых клеток



# Основные причины ранней смерти после HLA-совместимой аллогенной трансплантации 1994-1999



# Профилактика РТПХ

- циклоспорин А 3-12,5 мг/кг с -1 дня до +100-й день с уменьшением дозы на 5% в неделю с +101 дня до полной отмены.
- метотрексат 15 мг/м<sup>2</sup> день +1-й, 10 мг/м<sup>2</sup> день +3,+6,+11-й.

(селлсепт, глюкокортикоиды, АТГ,

Т-депрессант, Г-КСФ такредимус)

# Профилактика токсических и инфекционных осложнений

- Форсированный диурез
- Аллопуринол
- Дифенин
- Гепарин
- Деконтаминация кишечника
- Ацикловир (ганцикловир)

# Оценка приживления донорских стволовых стволовых клеток

- Гематологические показатели
- Цитогенетическое исследование
- Молекулярно-генетическое исследование (ПЦР, VNTR локусы, аллельный полиморфизм)
- Большие и малые эритроцитарные

# **Ранние осложнения аллогенной трансплантации стволовых клеток**

- Острая реакция трансплантат против хозяина
- Геморрагический цистит
- Венооклюзионная болезнь печени
- Капиллярный leak синдром
- Синдром приживления
- Диффузные альвеолярные геморрагии
- Тромботическая микроангиопатия

**Table 6. Proposed Clinical Staging/Grading of Acute GVHD Including the Upper GI Tract**

Clinical Stage	GI GVHD
+	>500 mL diarrhea/d and/or anorexia, nausea*
++	>1,000 mL diarrhea/d and/or food intolerance, vomiting*
+++	>1,500 mL diarrhea/d
++++	Severe abdominal pain, with or without ileus
Overall Clinical Grade of Acute GVHD	
I	+ to ++ skin involvement; no GI involvement; no liver involvement; no decrease in clinical performance
II	+ to +++ skin rash; + lower GI; + to ++ upper GI involvement; + liver; mild decrease in performance
III	++ to +++ skin rash; ++ to +++ lower GI; ++ to ++++ liver (or both); marked decrease in performance
IV	++ to ++++ organ involvement with extreme decrease in clinical performance

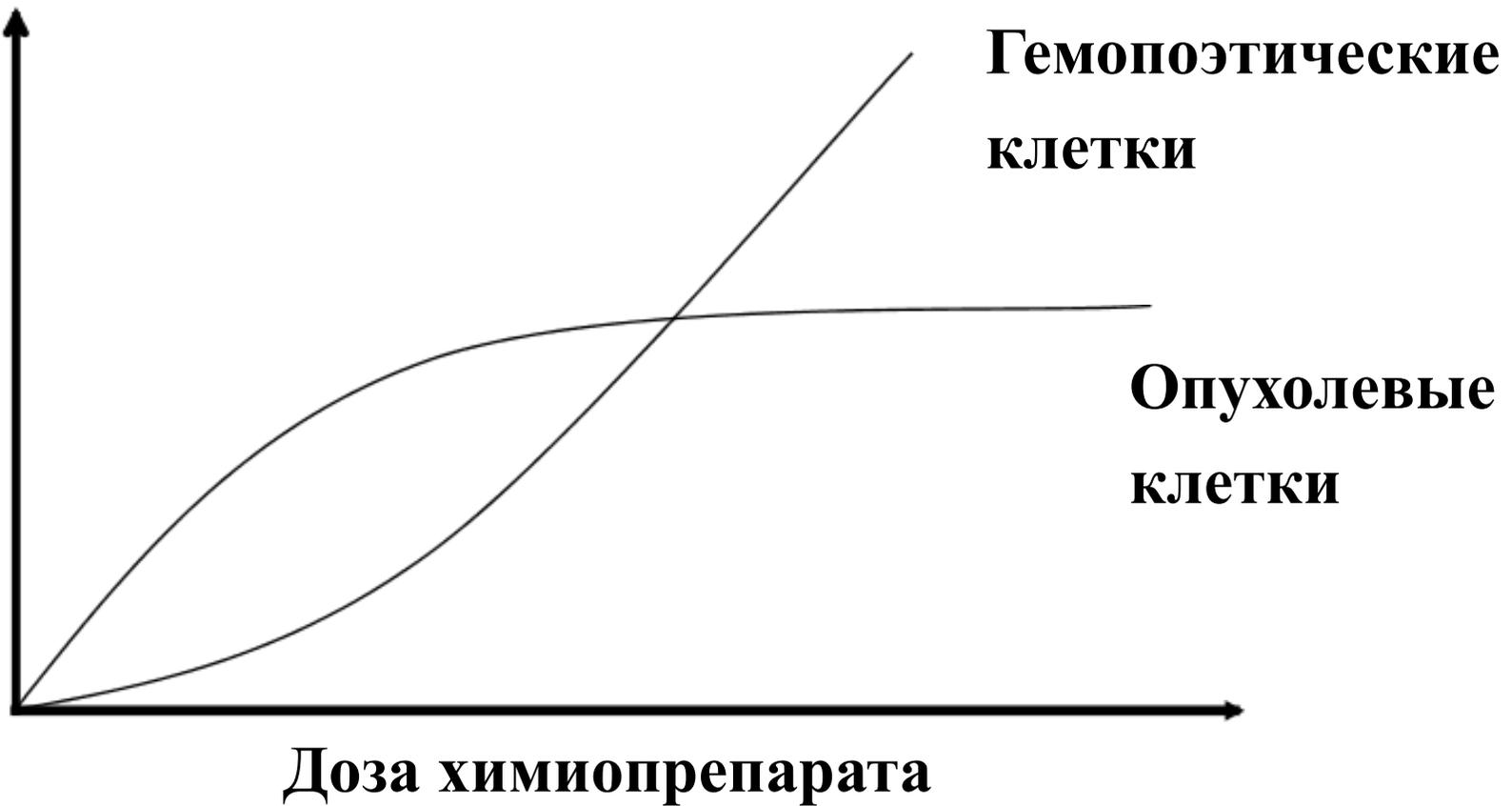
## Поздние осложнения аллогенной трансплантации

- Хроническая <sup>стволовых клеток</sup> РТПХ
- Инфекционные осложнения
- Фиброз легких
- Эндокринная недостаточность
- Катаракта

Аутологичная трансплантация  
гемопоэтических стволовых клеток  
выполняется с целью восстановления  
гемопоэза после применения  
сублетальных доз лучевой и/или  
химиотерапии у онкогематологических  
больных.

# Чувствительность опухолевых и гемопоэтических клеток к химиотерапии

● ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ

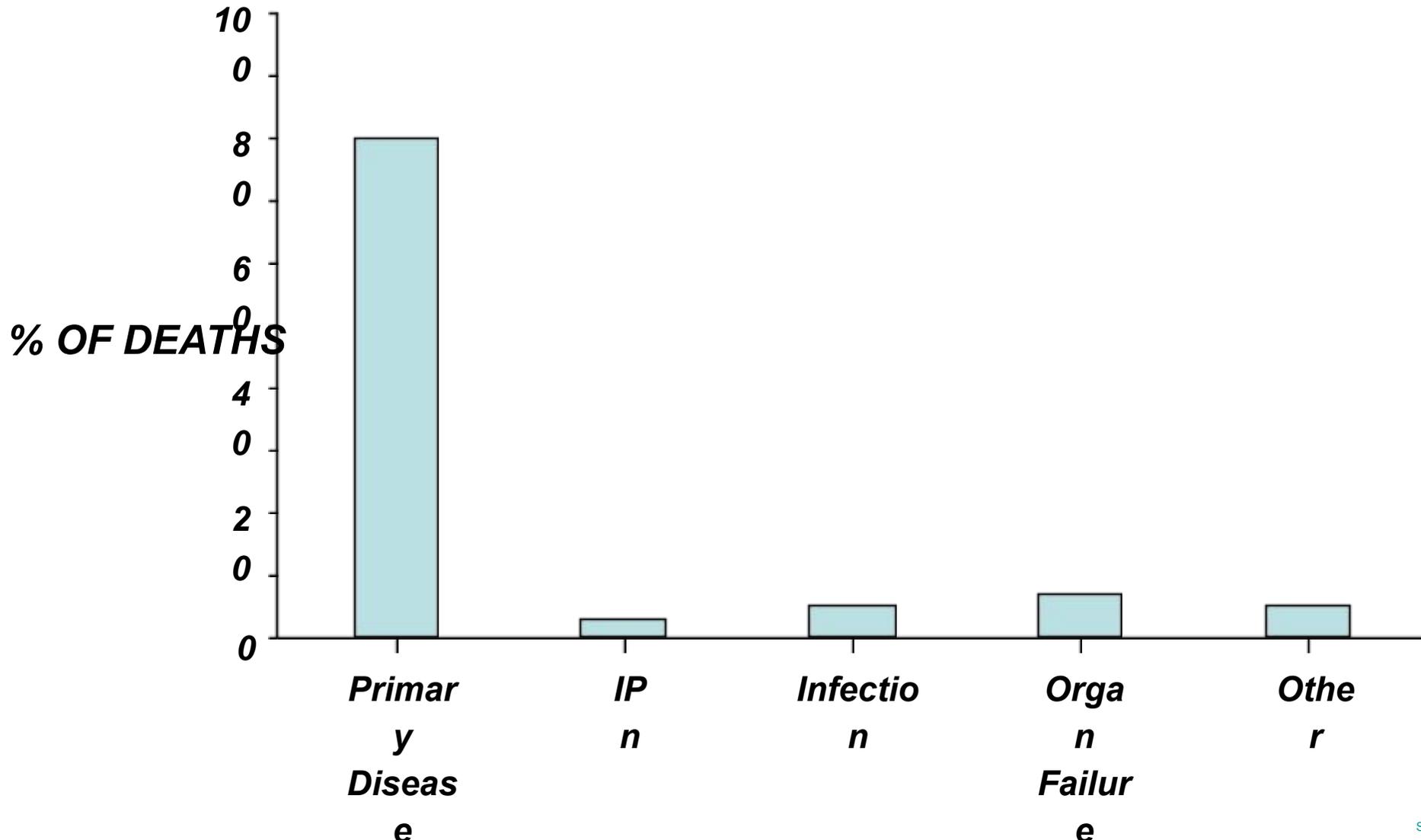


# Методология аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

**Основные этапы выполнения аутологичной  
трансплантации стволовых клеток крови или  
костного мозга :**

- **предтрансплантационная подготовка  
больного,**
- **заготовка аутотрансплантата (оценка  
количественной и качественной  
полноценности трансплантата, очистка?),**
- **кондиционирование к трансплантации,**

# Причины смерти после аутологичной трансплантации стволовых клеток 1994-1999

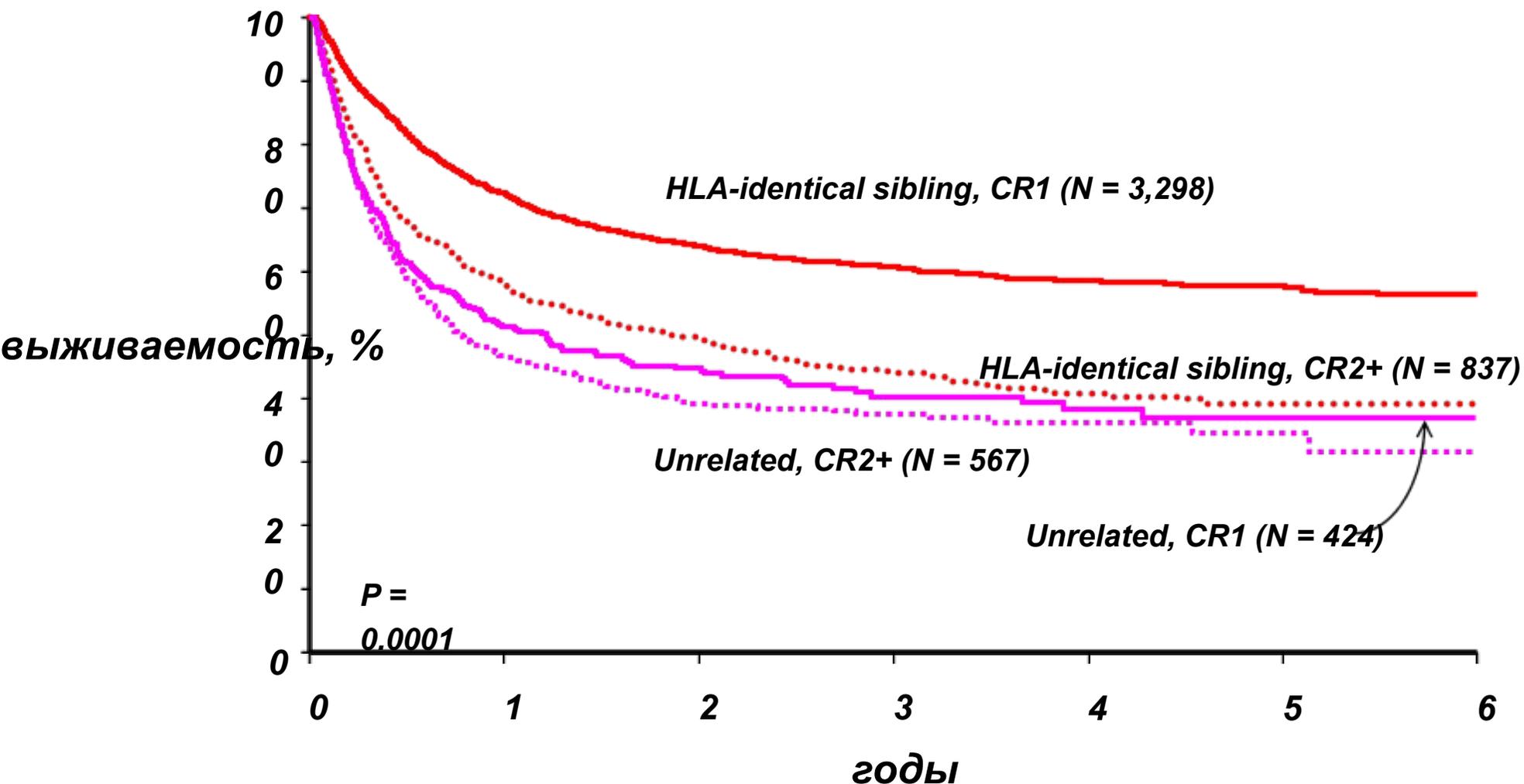


**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ОСТРЫХ НЕЛИМФОБЛАСТНЫХ ЛЕЙКОЗАХ**

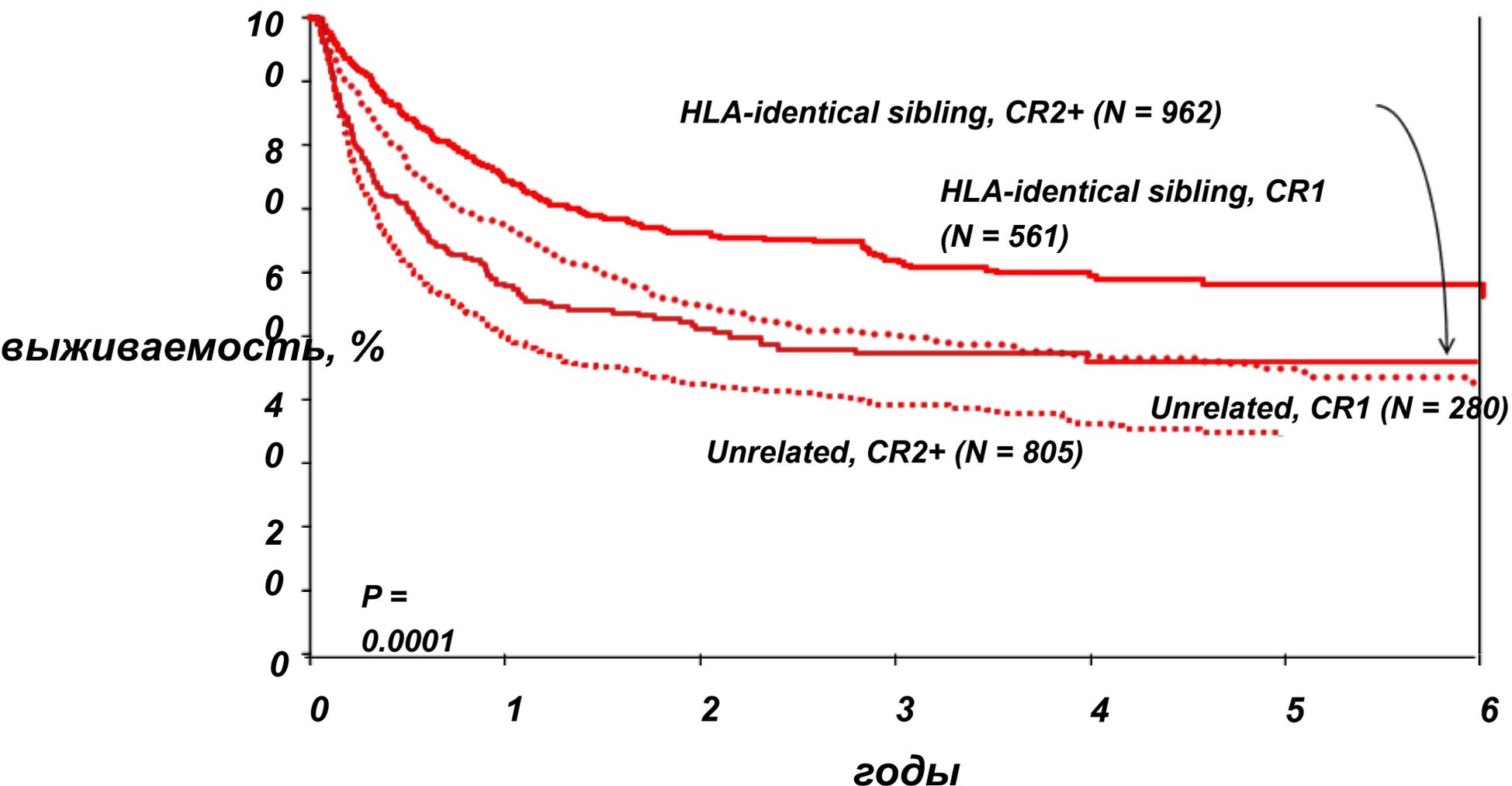
**больных (10972 ~~1988~~ год-2001)**

Виды трансплантации стволовых клеток	LFS	TRM	LFS	TRM
	CR1	CR1	CR2	CR2
Трансплантация аутологичного костного мозга без очистки	45 ± 2	13 ± 1	33 ± 3	21 ± 3
Трансплантация аутологичного костного мозга с очисткой	50 ± 2	12 ± 2	36 ± 4	20 ± 3
Трансплантация аутологичных ПСК	40 ± 3	16 ± 4	27 ± 5	17 ± 4
Трансплантация аллогенного костного мозга родственного HLA идентичного	60 ± 1	24 ± 1	43 ± 2	35 ± 2
Трансплантация аллогенных ПСК родственников HLA идентичных	53 ± 3	31 ± 3	46 ± 7	44 ± 8
Трансплантация аллогенного костного мозга неродственного HLA идентичного	41 ± 8	36 ± 6	27 ± 4	52 ± 6
Трансплантация аллогенных стволовых клеток родственников HLA несовместимых	46 ± 5	37 ± 5	28 ± 5	56 ± 6

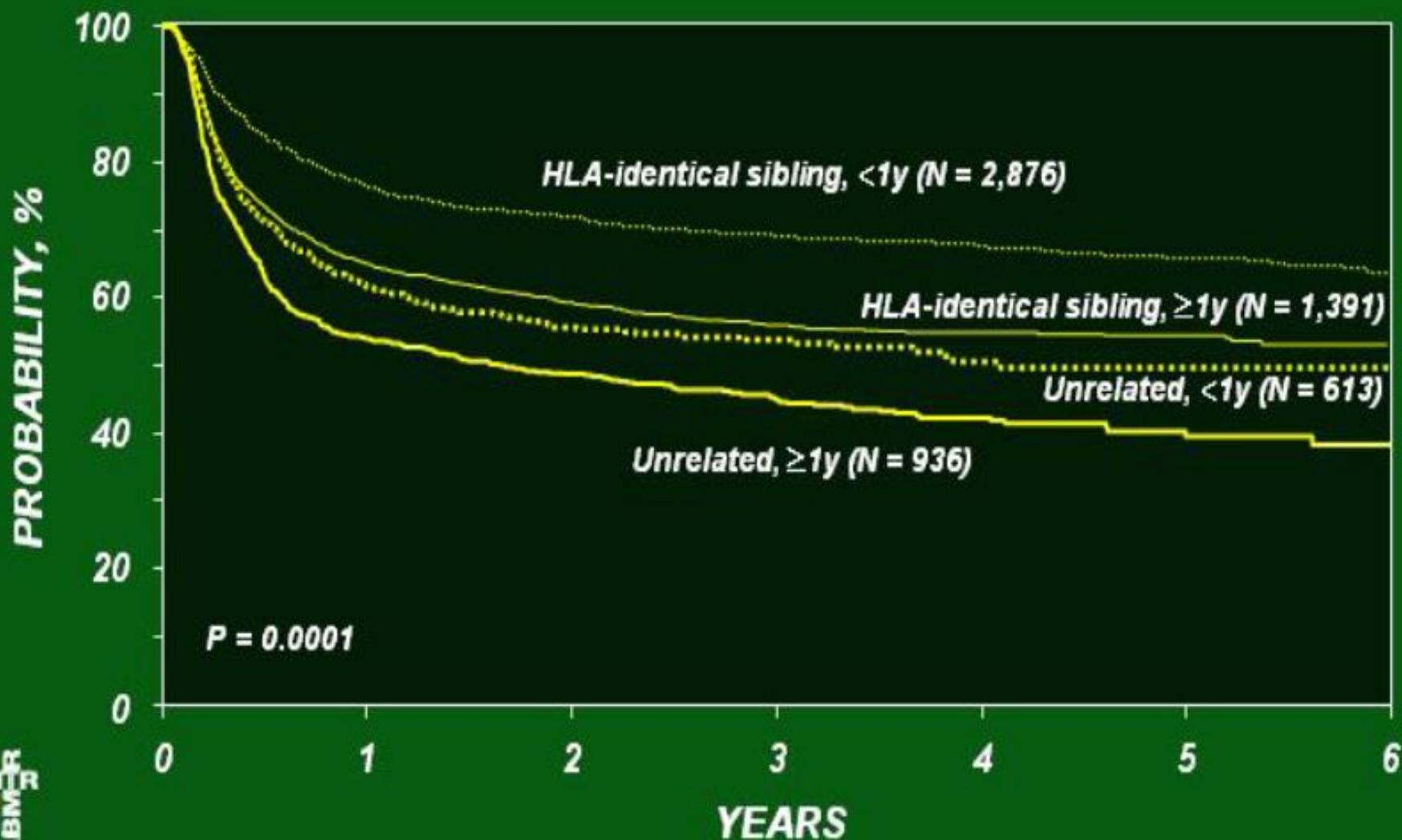
# Общая выживаемость больных острыми нелимфобластными лейкозами после аллогенной трансплантации стволовых клеток (IBMTR, 2000)



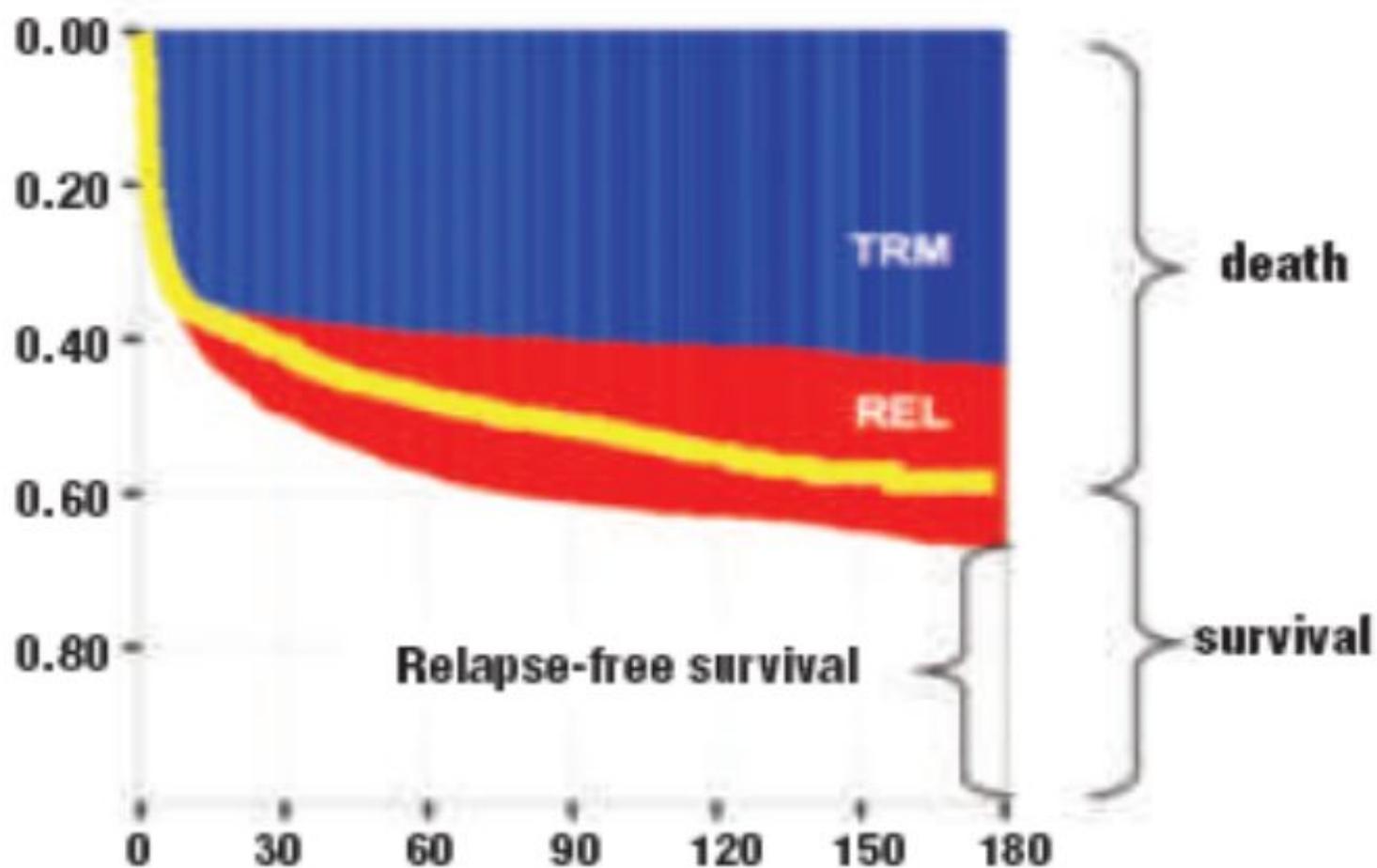
# Общая выживаемость больных острыми лимфобластными лейкозами после аллогенной трансплантации стволовых клеток (IBMTR, 2000)



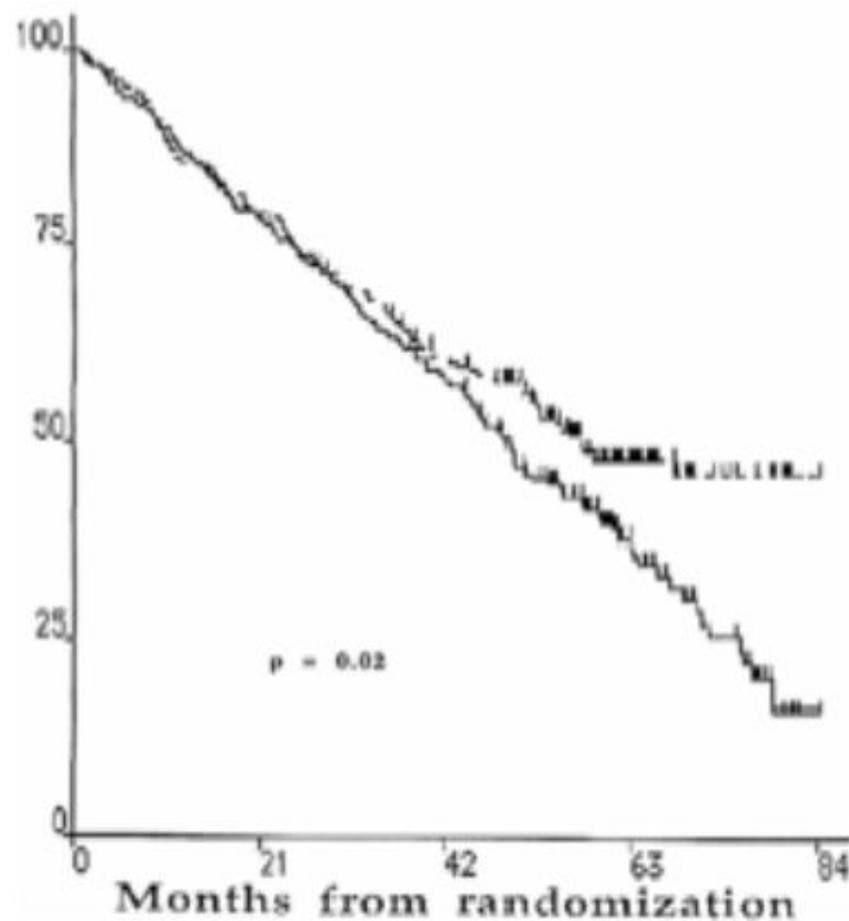
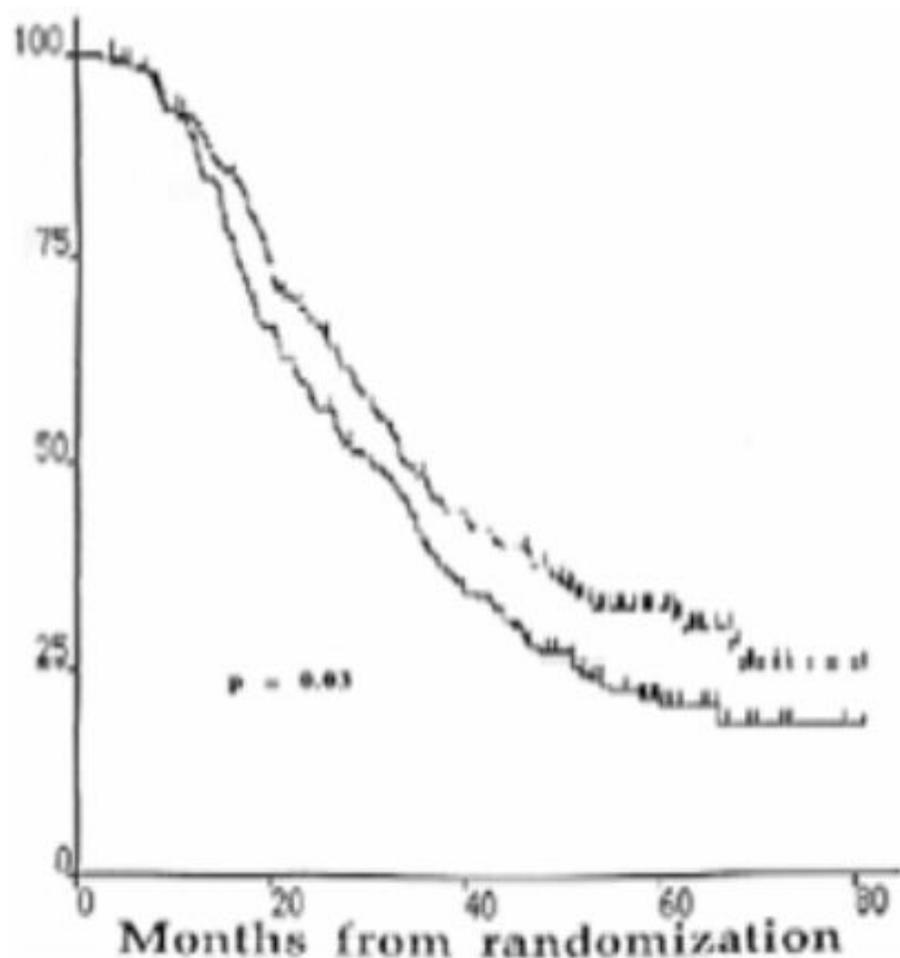
# PROBABILITY OF SURVIVAL AFTER ALLOGENEIC TRANSPLANTS FOR CML IN CHRONIC PHASE BY DONOR TYPE AND DISEASE DURATION, 1994-1999



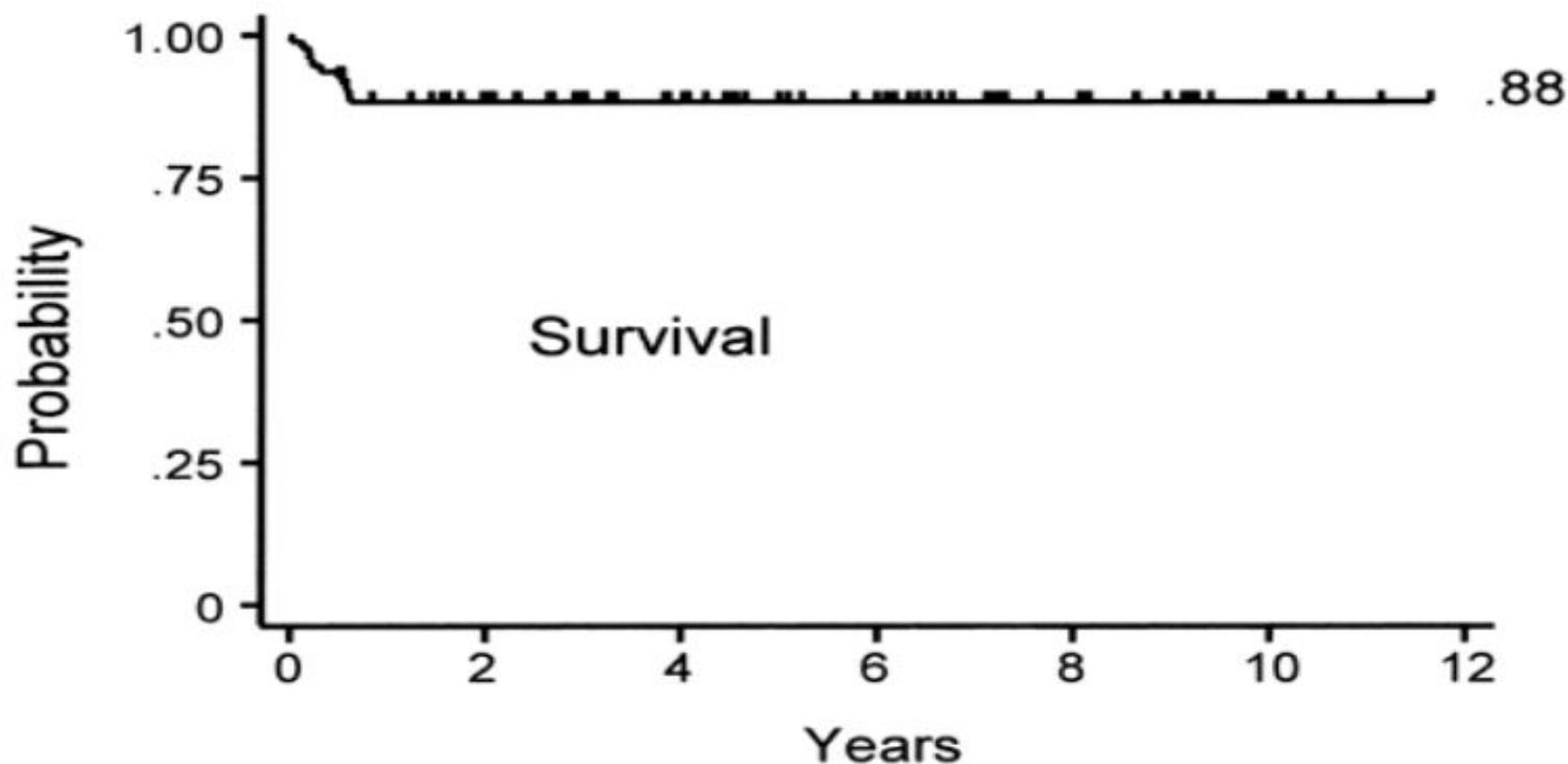
# Безрецидивная выживаемость больных ХМЛ, которым выполнена ТСК в 1980-1990 годах



# Бессобытийная и общая выживаемость больных множественной миеломой после 1 или 2 трансплантаций аутологичных стволовых клеток (К.С.Anderson e.a.,2002)

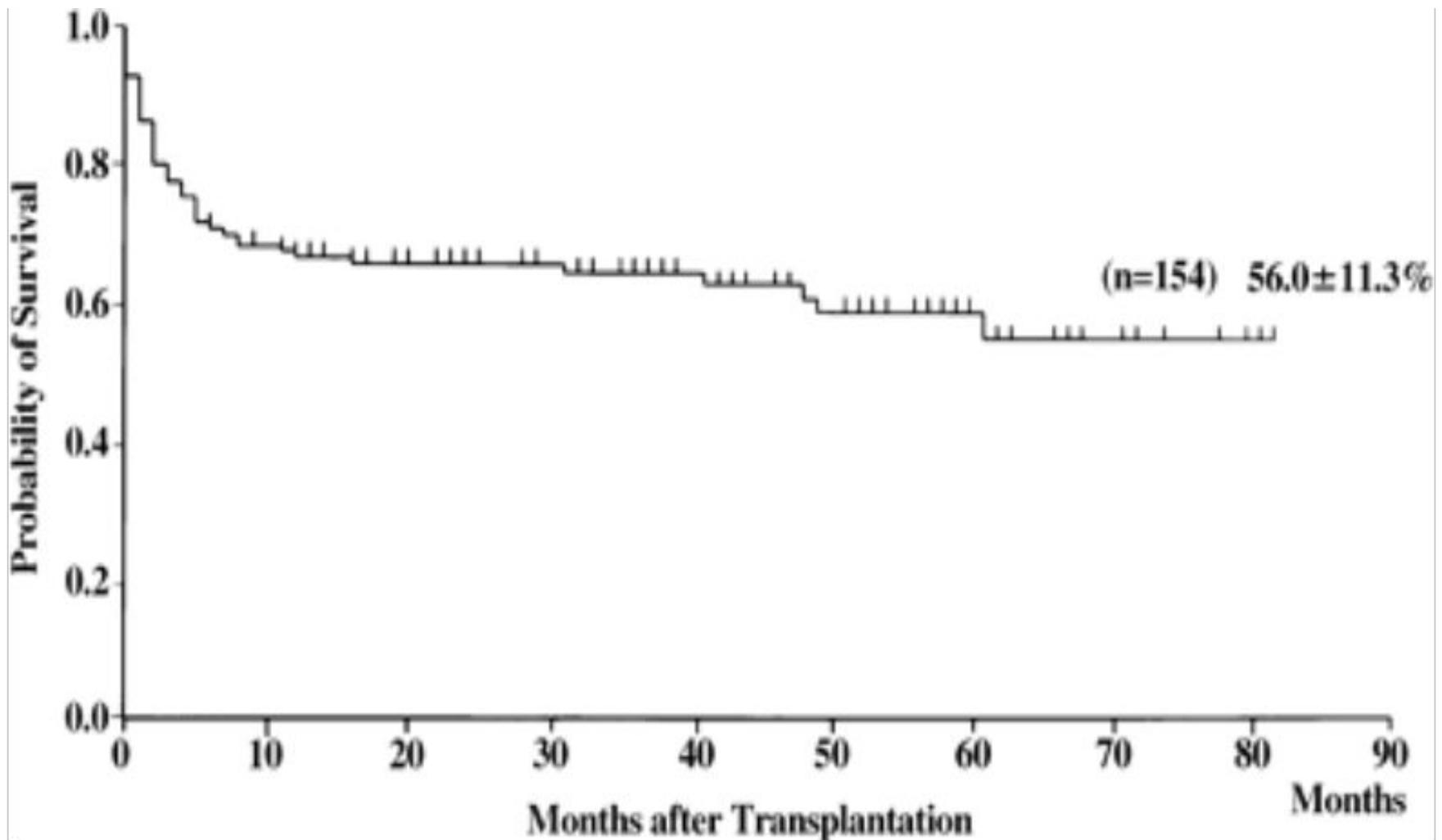


# Эффективность трансплантации гемопоэтических стволовых клеток от HLA-совместимого донора родственника у больных апластической анемией



(From Storb R, Blume KG, O'Donnell MR, et al: Cyclophosphamide and antithymocyte globulin to condition patients with aplastic anemia for allogeneic marrow transplantations: The experience in four centers. Biol Blood Marrow Transplant 7:39-44, 2001.)

# Общая выживаемость больных апластической анемией после неродственной HLA-совместимой ТСК



# Концептуальная основа для трансплантации стволовых клеток при аутоиммунных заболеваниях

- Эрадикация иммунных эффекторов
- Восстановление нормальной функции системы иммунитета за счет удаления эффекторных факторов – КОНТРОЛЬ АУТОИММУННОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ
- Восстановление иммунной системы (без аутореактивности) за счет приживления трансплантата
- Выключение пусковых механизмов заболевания
- Противовоспалительный эффект –

# Схема трансплантации ГСК при аутоиммунных

## заболеваниях

Очистка in vivo    Очистка in vitro    Очистка in vivo



↓ **ВОСПАЛЕНИЯ**

↑ CD34+  
 ↓ Т-клетки  
 ↓ В-клетки  
 ? НК-клетки  
 ? Макрофаги  
 ? Дендритные  
 клетки

↑ CD34+  
 ↓ Т-клетки  
 ↓ В-клетки

↓ Т-клетки  
 ↓ В-клетки  
 ↓ Нейтрофилы  
 ↓ НК-клетки  
 ↓ Макрофаги  
 ↓ Продукция  
 ИК, ПГ, ЛТ,  
 цитокинов

N продукция  
 Цитокинов,  
 Ig, адгезион-  
 ных  
 молекул,  
 N CD69+,  
 CD8+,  
 В-лф,  
 ?CD4+,  
 Макрофаги,  
 Дендритные

## Эффективность трансплантации ГСК при аутоиммунных заболеваниях ( EBMT )

<b>Заболевание</b>	<b>TRM</b>	<b>Эффект/DPFS</b>
<b>Рассеянный склероз</b>	<b>6% (0-12%)</b>	<b>50% / 78%</b>
<b>Ювенильный идиопатический артрит</b>	<b>17% (3-31%)</b>	<b>80% / 50%</b>
<b>Ревматоидный артрит</b>	<b>4%(0-12%)</b>	<b>70% / 50%</b>
<b>Склеродермия</b>	<b>17% (7-27%)</b>	<b>70% / 50%</b>
<b>Системная красная волчанка</b>	<b>3% (0-27%)</b>	<b>80% / 70%</b>
<b>Общая группа</b>	<b>9%</b>	<b>2-х летняя ОВ- 89%</b>

# Трансплантация стволовых клеток в лечении сахарного диабета

- Трансплантация аутологичных стволовых клеток для лечения впервые выявленного (6 недель) диабета I типа с высоким содержанием антител к глутамат-декарбоксилазе. 7-36 месяцев инсулинонезависимость.
- Трансплантация аутологичных стволовых клеток для лечения макроангиопатий (диабетической стопы) при диабете II типа

**Использование стволовых клеток у экспериментальных животных в ранний постинфарктный период снижает не только выраженность зон повреждения, но и улучшает сократительную способность миокарда, препятствует постинфарктному ремоделированию левого желудочка**

(Orlic D et al., 2001)

# *Потенцильные возможности терапии ГСК в кардиологии*

- **Дифференцировка в  
кардиомиоциты**

- **Ангиогенез**

Ишемическая болезнь сердца

ОИМ

стенокардия высокого функционального класса

ишемическая кардиомиопатия – сердечная

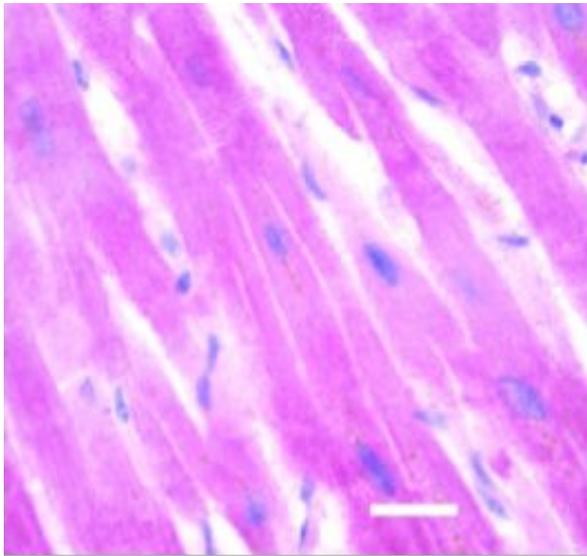
недостаточность

Дилатационная кардиомиопатия

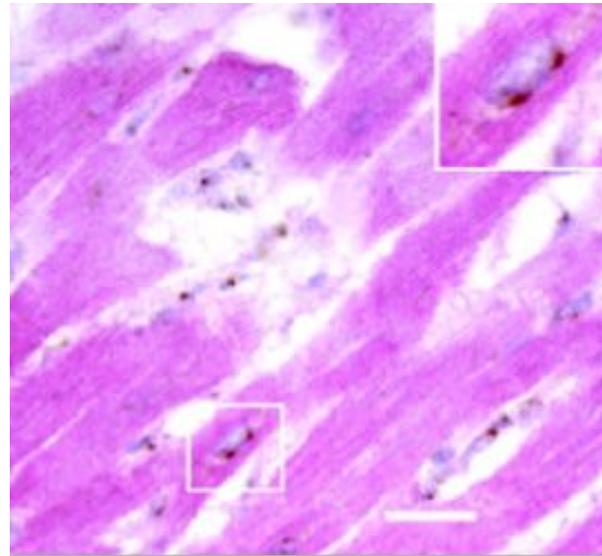
Поддерживающая терапия при хирургической коррекции

пороков сердца

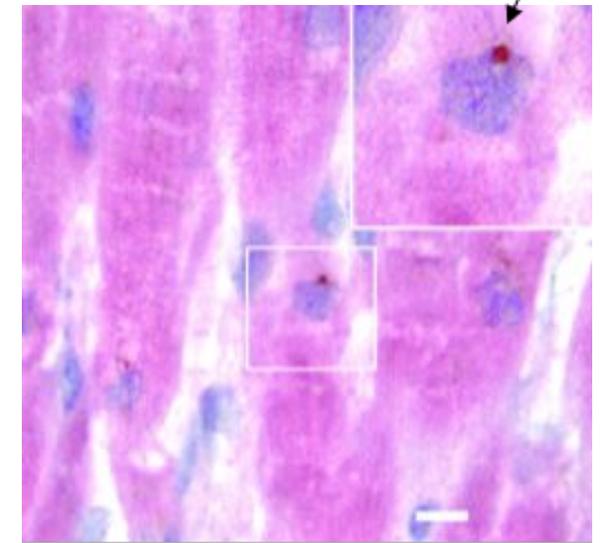
# Доказательство возможности образования кардиомиоцитов из циркулирующих стволовых клеток



**женское сердце  
(Y хромосома -)**



**мужское сердце  
(Y хромосома +)**



**FISH визуализация Y хромосомы в кардиомиоцитах (меченных MF20 к миозину сарколеммы) женского донорского сердца, пересаженного мужчине**

# Методы введения стволовых клеток

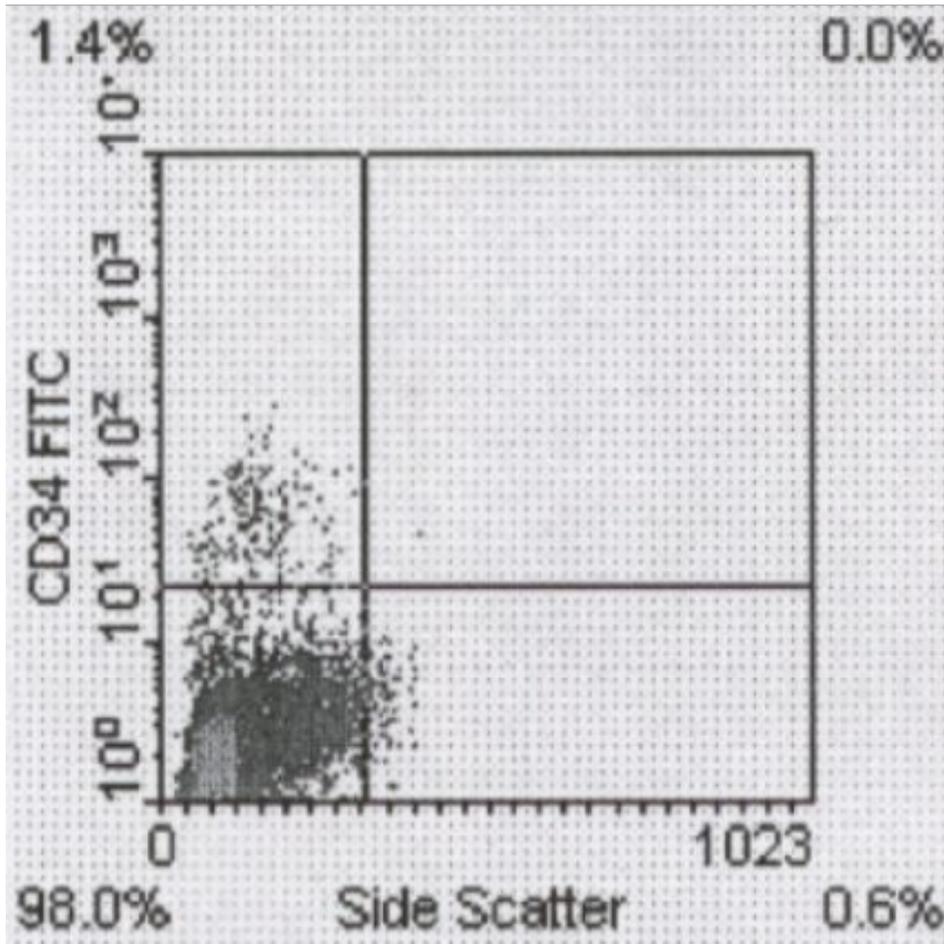
- **в/в введение**
- **интракоронарное введение при коронароангиографии**
- **интрамиокардиальное катетерное введение со стороны ЛЖ с использованием системы NOGA**
- **интракоронарное введение при операции АКШ**
- **интрамиокардиальное введение при операции АКШ**

**В настоящее время в литературе имеются ссылки о**

# Возможные эффекты введения стволовых клеток у больных ИБС

- Снижение функционального класса стенокардии
- Увеличение толерантности к физической нагрузке
- Увеличение фракции выброса
- Уменьшение ремоделирования

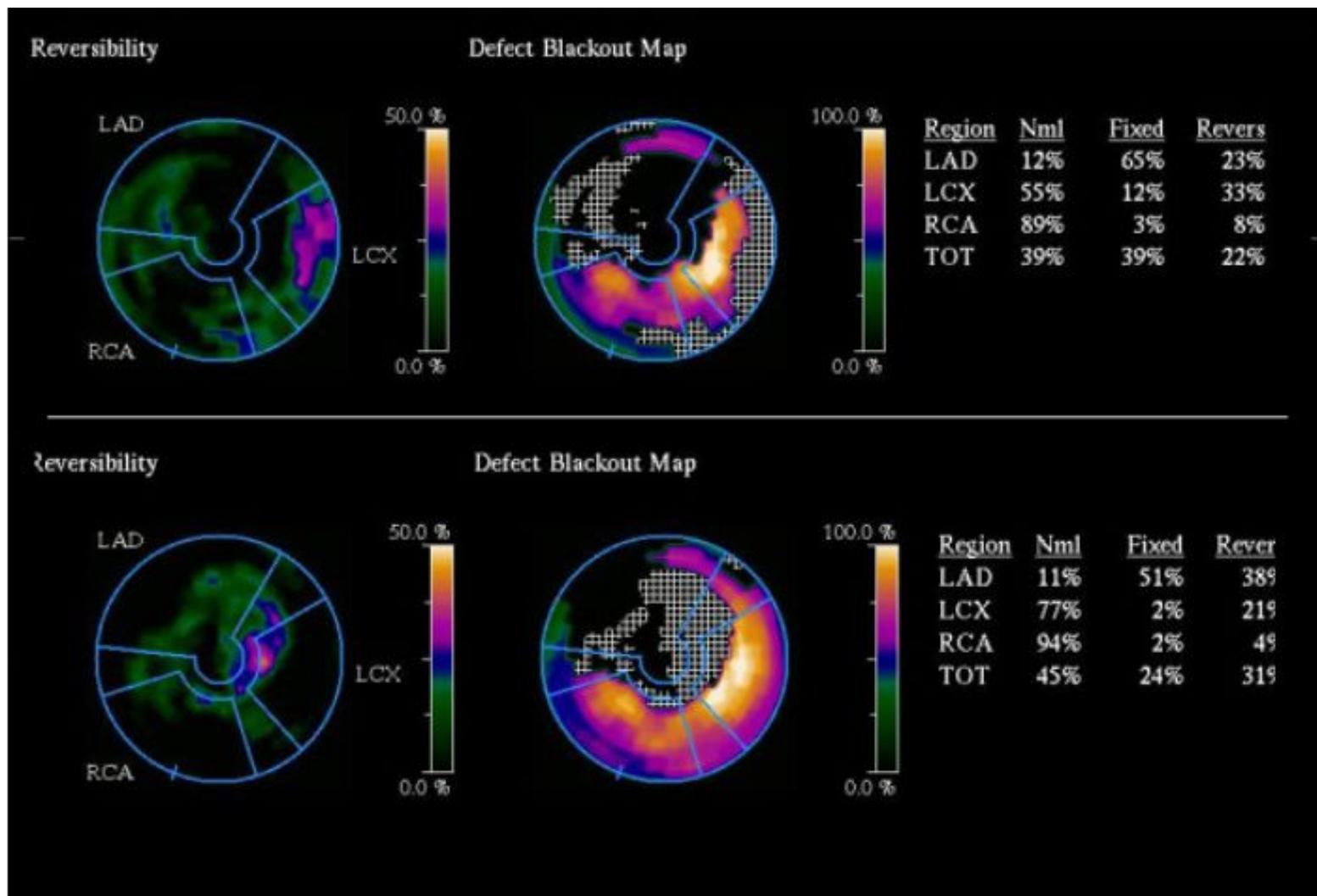
# Проточная цитометрия трансплантата



- Количество CD-34+ клеток -  $1,0 - 1,2 \times 10^6/\text{кг}$
- колониобразующая способность
- (КОЕ ГМ)  $13-19 \times 10^5$

# Данные ОФЕКТ больного С. до и после трансплантации СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА

До трансплантации



Через 3 мес после трансплантации