



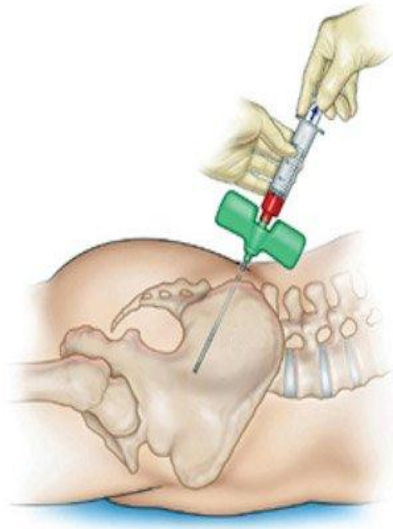
Клинические аспекты применения Мезенхимальных Стволовых Клеток. Молекулярные механизмы действия МСК при различных патологиях.

Докладчик:
Устинов Кирилл
Дмитриевич
ФГБУ «МГНЦ»

Москва,

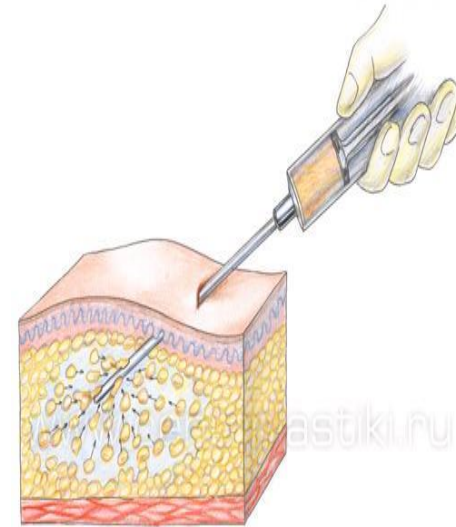
2016

Источники МСК для аутогенной клеточной терапии



Биопсия из
ККМ

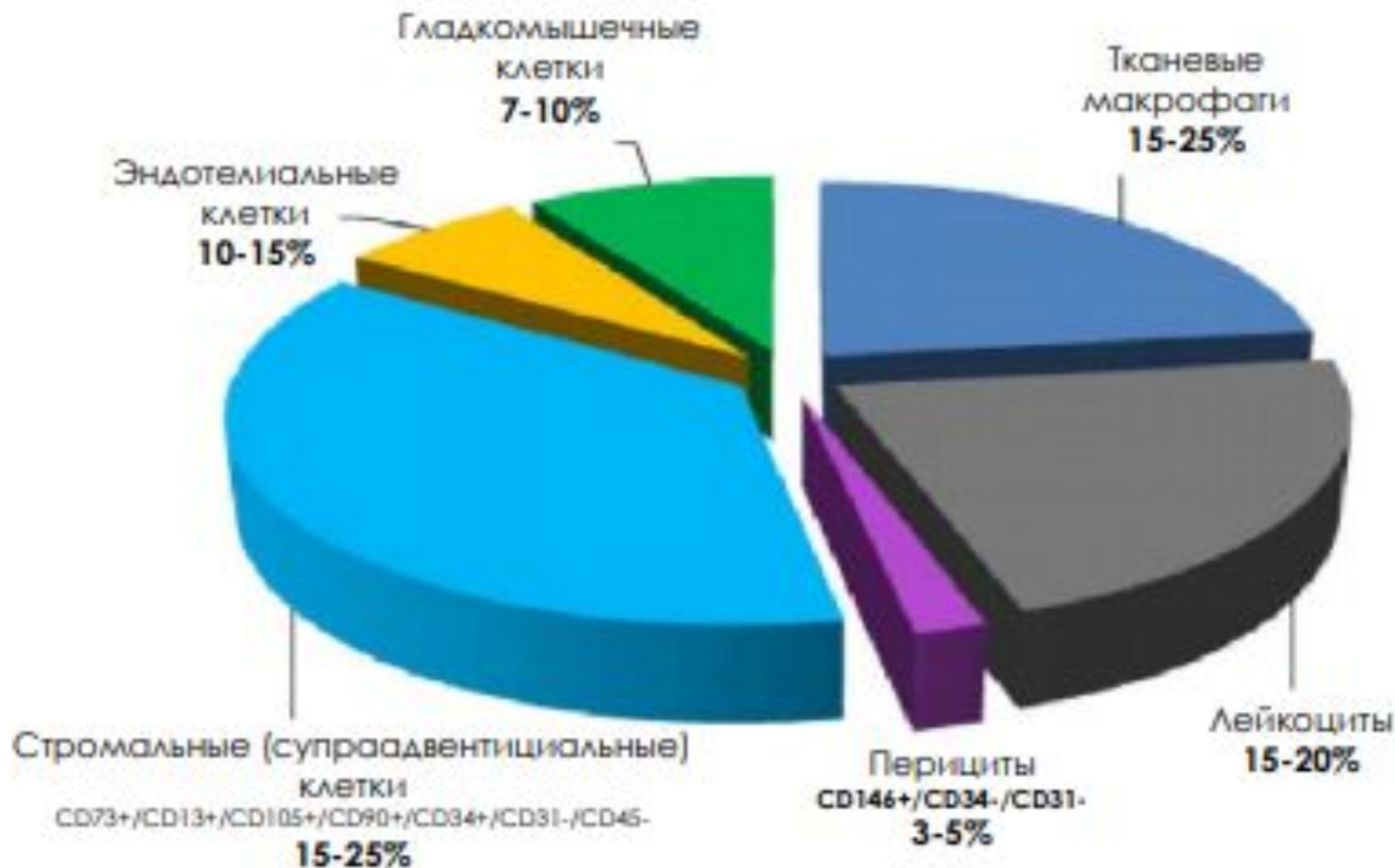
VS



Липосакци
я

1. В 2500 раза больше МСК
2. Меньшая травматичность
3. Присутствие помимо МСК

Стромально-васкулярная фракция

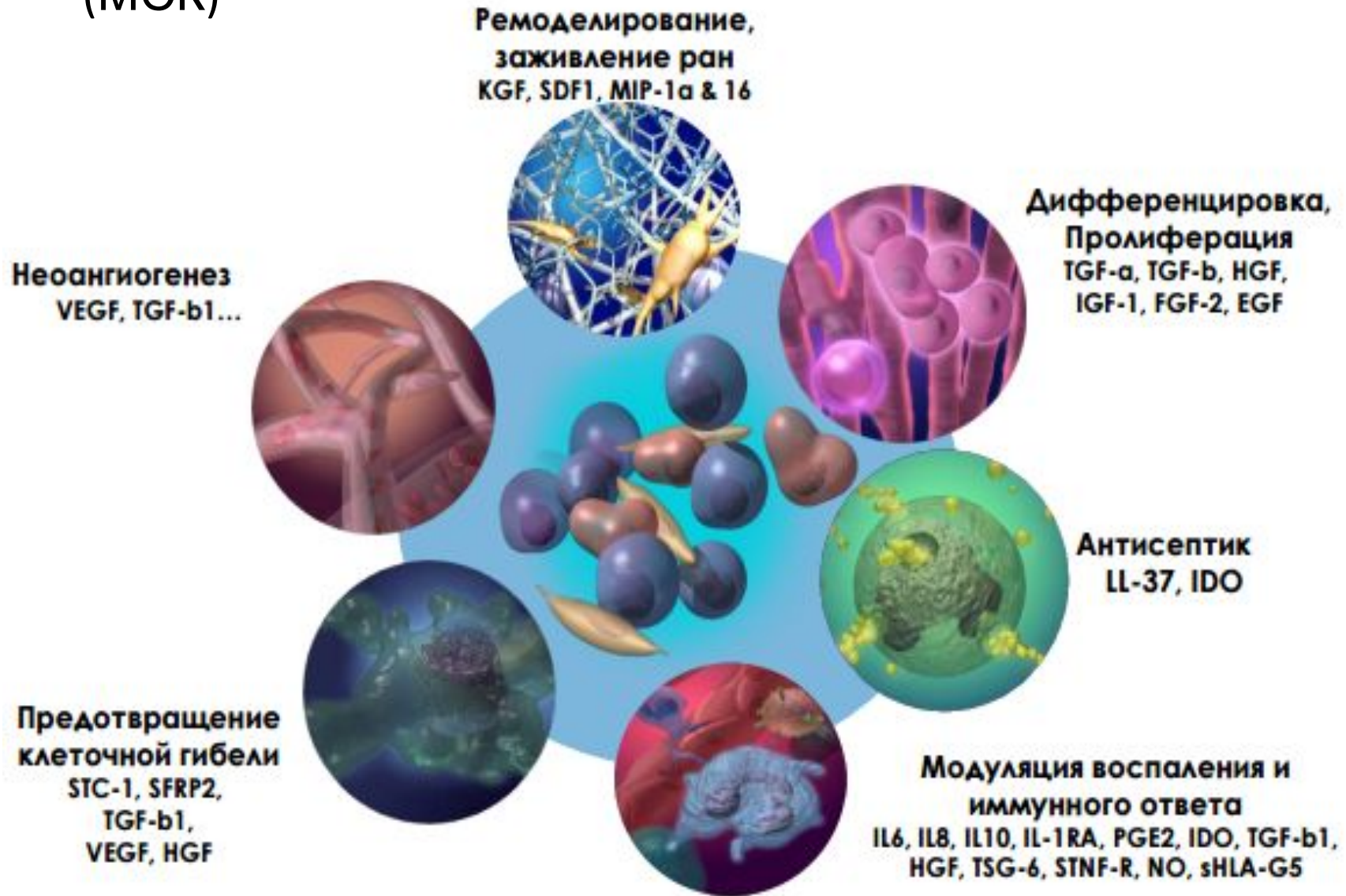


Bourin et al, 2013
Zimmerlin et al, 2013
Mitchell et al, 2006

Собственные данные

Adipose Derived Stromal Cells (including supraadventitial cells) CD34+dimCD45-CD31-CD146- with co-expression of stromal markers (CD105, CD90, CD73)	5,9%
Pericytes CD34-CD45- CD31-CD146+ with co-expression of stromal markers (CD105, CD90, CD73)	3,4%
Endothelial Progenitor Cells CD34+highCD45- CD31+CD146+CD90+CD105+	17,6%
Endothelial Cells CD34+dimCD45- CD31+CD146+highCD105+CD90+	4,6%
Vascular Smooth Muscle Cells CD34+dimCD45- CD31-CD146+CD105+CD90+	26%
WBCs	1%
RBCs	21,5%
Unidentified Cells	19%

Эффекты Мезенхимальных Стволовых Клеток (МСК)



МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

Стромальные (супраадвентициальные) клетки
CD73+/CD13+/CD105+/CD90+/CD34+/CD31-/CD45-

Перициты
CD34-CD45- CD31-CD146+

Проангиогенные цитокины:

- Ангиопоэтины: *Ang-1, Ang-2, Angiopoietin-like 2, Angiopoietin-like 4*
- Интерлейкины: *IL-6, IL-12 α , IL-8, IL-15, IL-17D, IL-18, IL-10, IL-32*
- Трансформирующие факторы роста: *BMP1, BMP2, BMP4, TGF β 1, TGF β 3*
- Факторы роста эндотелия сосудов: *VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, Placental growth factor*
- Матриксные протеазы: *MMP2, MMP3, MMP11, MMP14, MMP23, UPA*
- Факторы роста фибробластов: *FGF1, FGF2, FGF5, FGF20, FGF21*

АНГИОГЕНЕЗ

TISSUE ENGINEERING: Part A
Volume 15, Number 8, 2009
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/ten.tea.2008.0359

Original Article

**Adipose Stromal Cells Stimulate Angiogenesis via Promoting
Progenitor Cell Differentiation, Secretion of Angiogenic
Factors, and Enhancing Vessel Maturation**

Kseniya Rubina, Ph.D.,¹ Natalia Kalnina, Ph.D.,¹ Anastasia Efimenko,¹ Tatyana Lopatina,¹
Varvara Melkhova,² Zoya Tsokolova, Ph.D.,² Veronika Syssova, Ph.D.,¹
Vsevolod Tkachuk, D.Sc.,¹ and Yelena Parfyonova, D.Sc.^{1,2}

МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

Стромальные (супраадвентициальные) клетки
CD73+/CD13+/CD105+/CD90+/CD34+/CD31-/CD45-

Перициты
CD34-CD45- CD31-CD146+

Нейротрофические факторы

- NGF (фактор роста нервов)
- BDNF (мозговой нейротрофический фактор)
- GDNF (нейротрофический фактор глиальных клеток)
- NENF (нейрональный фактор роста)

Специфические белки матрикса:

- Основной миелиновый белок
- Протеолипид-1
- Периферический миелиновый белок
- Миелиновый белок-эро

ИНДУКЦИЯ
РОСТА НЕРВНЫХ
ОКОНЧАНИЙ

Adipose-Derived Stem Cells Stimulate Regeneration of Peripheral Nerves: BDNF Secreted by These Cells Promotes Nerve Healing and Axon Growth *De Novo*

Tatiana Lopatina^{1*}, Natalia Kalinina¹, Maxim Karagyaour¹, Dmitry Stambolsky¹, Kseniya Rubina¹, Alexander Revischin², Galina Pavlova², Yelena Parfyonova¹, Vsevolod Tkachuk¹

МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

Стромальные (супраадвентициальные) клетки
CD73+/CD13+/CD105+/CD90+/CD34+/CD31-/CD45-

Перициты
CD34-CD45- CD31-CD146+

Матриксные белки:

- Протеогликаны: Бигликан, Версикан, Люмикан, Синдекан-ВР, Глипикан 1, Перлекан, Синдекан
- Коллагены: Коллагены I, III, V, VI, VII, XII, XVI типов, Лизил оксидаза
- Эластиновый матрикс: Эластин, Фибрилларин, Фибриллин 1, 2; Фибулин 1, 2, 5
- Базальная мембрана: Ламинин γ , Ламинины α 1,2,3,4; Ламинины β 1, 2; Нидоген
- Прочие белки матрикса: Белок внеклеточного матрикса 1, Белок внеклеточного матрикса 2

РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ
МЕЖКЛЕТОЧНОГО
МАТРИКСА

МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

Стромальные (супраадвентициальные) клетки
CD73+/CD13+/CD105+/CD90+/CD34+/CD31-/CD45-

Перициты
CD34-CD45- CD31-CD146+

Иммуномодуляторные свойства:

- продуцируют ингибитор комплемента – фактор H
- подавляют пролиферацию естественных киллеров и их цитотоксическую активность
- подавляют превращение моноцитов в дендритные клетки
- подавляют активацию Т-лимфоцитов
- ингибируют синтез иммуноглобулинов

МОДУЛЯЦИЯ
ИММУННОГО
ОТВЕТА

Interactions Between Human Mesenchymal Stem Cells and
Natural Killer Cells

PANAGIOTA A. SOTIROPOULOU, SONIA A. PEREZ, ANGELOS D. GRITZAPIS, CONSTANTIN N. BAKICANIS,
MICHAEL PAPANICHAEL

STEM CELLS 2006;24:74–85

Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function
of monocyte-derived dendritic cells

Xiao-Xia Jiang, Yi Zhang, Bing Liu, Shuang-Xi Zhang, Ying Wu, Xiao-Dan Yu, and Ning Mao

BLOOD, 15 MAY 2005 • VOLUME 105, NUMBER 10

Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions

Anna Corcione, Federica Benvenuto, Elisa Frenetti, Debora Giunti, Valentina Cappelletti, Francesco Cazzanti, Marco Rago,
Francesca Guatelli, Giovanni Luigi Mancardi, Vito Pistoia, and Antonio Uccelli

BLOOD, 1 JANUARY 2006 • VOLUME 107, NUMBER 1

ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

Эндотелиальные клетки предшественницы
CD34+highCD45- CD31+CD146+CD90+CD105+

Эндотелиальные клетки
CD34+dimCD45- CD31+CD146+highCD105+CD90+

Цитокиновый профиль:

Ангиогенные: *IL-10, IL-18, IL-8, erythropoietin, VEGF*

Молекулы адгезии: *ICAM-1, ICAM-2, PECAM, VCAM, E-selectin, P-selectin*

Противовоспалительные : *IL-1ra, IL-10, IL-13, TGFβ*

Провоспалительные: *TNFα, IL-1, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-11, IL-15, MCP-1, GM-CSF, CD40/40L, Endothelin-1, RANTES*

Нормальное состояние

Эндотелиальные
клетки



- Непроницаемы для больших молекул
- Вырабатывают противовоспалительные цитокины
- Препятствуют адгезии лейкоцитов
- Способны к вазодилатации
- Препятствуют тромбообразованию

Активированное



- Увеличение проницаемости
- Вырабатывают провоспалительные цитокины
- Экспрессируют молекулы адгезии лейкоцитов
- Снижение выработки молекул вазодилатации
- Снижение выработки молекул препятствующих тромбообразованию

АНГИОГЕНЕЗ

МОДУЛЯЦИЯ
ВОСПАЛЕНИЯ

ГЛАДКОМЫШЕЧНЫЕ КЛЕТКИ

CD34+dimCD45- CD31-CD146+CD105+CD90+

Цитокиновый профиль:

IL-1, IL-6, TNF α , MCP-1, EGF, GM-CSF, PGE2

Хемокины: CCL5, CCL7, CCL11, CCL13, CXCL8

Компоненты внеклеточного матрикса

Нормальное состояние

Гладкомышечные
клетки



- Контрактивная функция
- Синтез внеклеточного матрикса
- Располагаются в t. media

Активированное



- Выработка провоспалительных цитокинов
- Усиление синтеза внеклеточного матрикса
- Миграция в субинтимальный слой и пролиферация

АНГИОГЕНЕЗ

МОДУЛЯЦИЯ
ВОСПАЛЕНИЯ

РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ
МЕЖКЛЕТОЧНОГО
МАТРИКСА

ТКАНЕВЫЕ МАКРОФАГИ

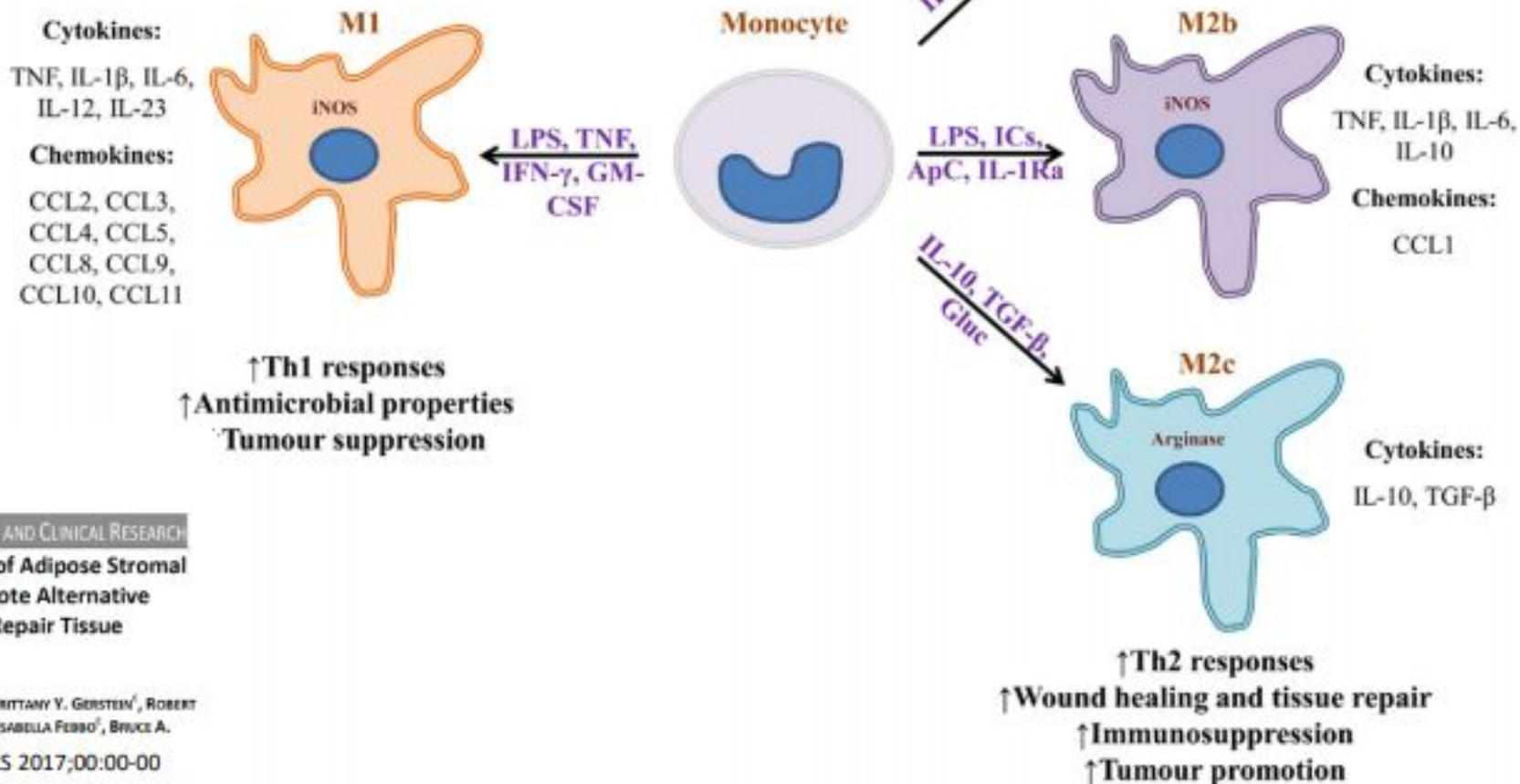


Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases

Guillermo Arango Duque^{1,2*} and Albert Descoteaux^{1,2*}

¹ INRS-Institut Armand Frappier, Laval, QC, Canada

² Centre for Host-Parasite Interactions, Laval, QC, Canada



TRANSLATIONAL AND CLINICAL RESEARCH

Immunomodulatory Effects of Adipose Stromal Vascular Fraction Cells Promote Alternative Activation Macrophages to Repair Tissue Damage

ANNE C. BOWLES^{1,2*}, RACHEL M. WISE¹, BRITTANY Y. GERSTEIN¹, ROBERT C. THOMAS¹, ROBERTO OGELMAN¹, ISABELLA FERRO², BRUCE A. BUNNELL^{1,2*}

STEM CELLS 2017;00:00-00

Author by a member of



Leukocytes

white blood cells ~ WBC

agranular

granular

lymphocytes
20 - 25 %

monocytes
3 - 8%

basophils
.5 - 1%

neutrophils
60 - 70%

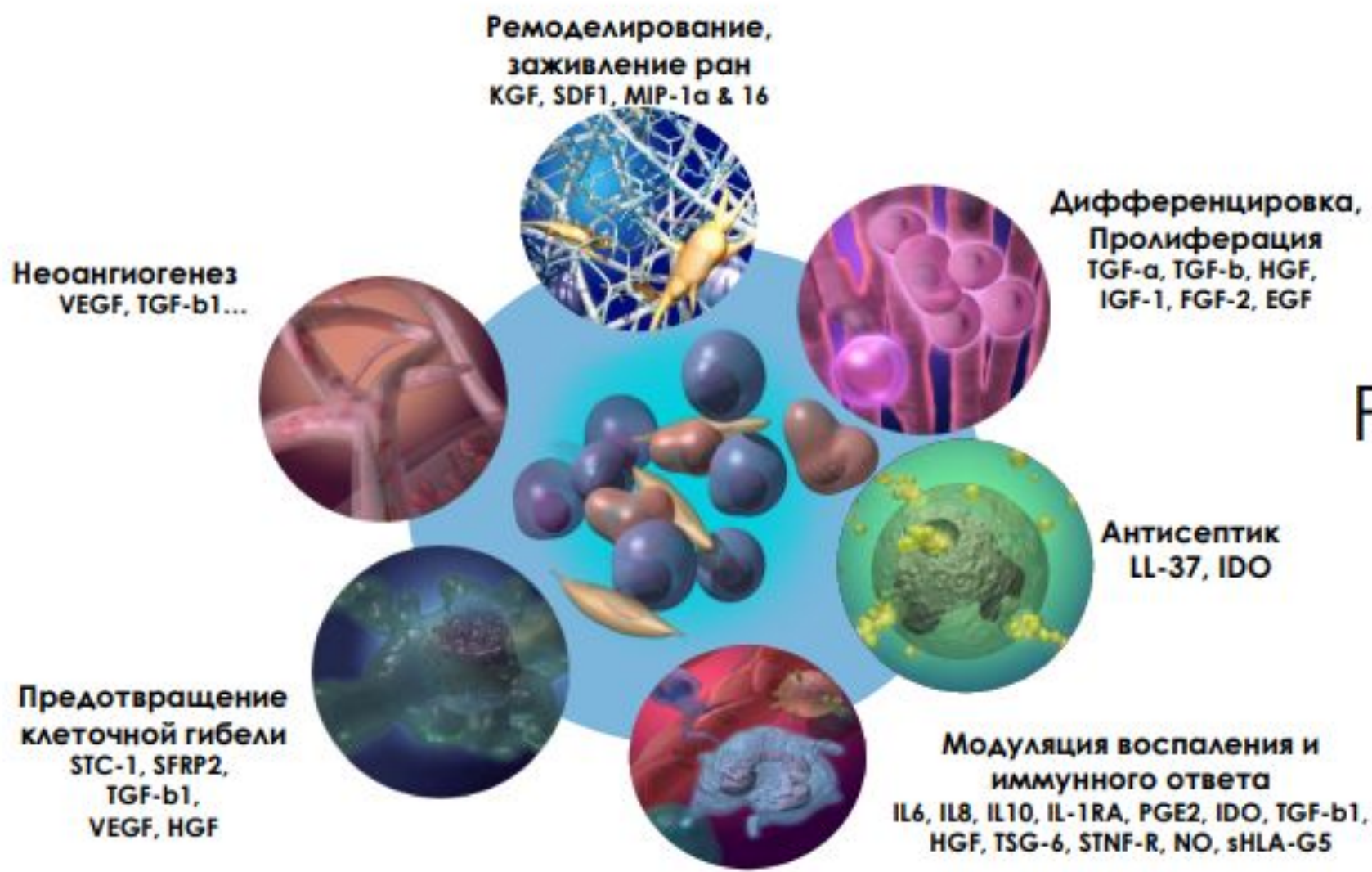
eosinophils
2 - 4%



T-cell, B-cell, NK Cell

МОДУЛЯЦИЯ
ВОСПАЛЕНИЯ

МОДУЛЯЦИЯ
ИММУННОГО
ОТВЕТА



Разные клетки =
сочетанное
воздействие

УЛУЧШЕНИЕ ПЕРФУЗИИ ПОВРЕЖДЕННЫХ ТКАНЕЙ

- а) Индукция ангиогенеза,
- б) Поддержание существующей сосудистой сети,
- в) Секреция проангиогенных цитокинов.

На мышинной модели показано формирование CD31+ эндотелиальных клеток из СВФ, меченной GFP.

Lu F et al. Plast Reconstr Surg (2008) 121(1):50-8; Karathanasis V et al. Eur J Plast Surg (2013) 36(5):281-8

Установлена прямая зависимость между плотностью капиллярной сети и присутствием меченой флуоресцентной меткой СВФ в просвете или рядом с капиллярами

Lu F et al. Plast Reconstr Surg (2008) 121(1):50-8; Boer PC et al. Stem Cells Int (2012) 2012(3):1-11; Zografou A et al. J Plast Reconstr Aesthet Surg (2011) 64(12):1647-56.

Стромальные клетки, выделенные из капиллярной сети, выращенной в матрикеле, экспрессируют vWF.

Ebrahimian TG et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol (2009) 29(4):503-10; Efo H et al. Am J Pathol (2011) 178(5):2322-32.

Секретируемые СВФ цитокины (VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, IGF, PDGF-bb, FGF, TGF β , HGF, IL-6, IL-8, MMP inhibitor 1 precursor, MCP-1, ANG, и SDF-1) стимулируют реваскуляризацию.

Haubner F et al. Radiat Oncol (2013) 8(1):66; Hsiao ST-F et al. Stem Cells Dev (2012) 21(12):2189-203; Kilroy DE et al. J Cell Physiol (2007) 212(3):702-9; Forcheron F et al. PLoSOne (2012) 7(2):e31694; Yuan Y et al. Cell Biol Int (2013) 37(6):547-50; Rehman J. Circulation (2004) 109(10):1292-8; Pallua N et al. Plast Reconstr Surg (2009) 123(3):826-33; Uysal AC et al. Plast Reconstr Surg (2009) 124(3):804-15; Kapur SK et al. Biochimie (2013) 95(12):2222-8.

МОДУЛЯЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА И ВОСПАЛЕНИЯ

СВФ стимулирует ранозаживление

Стромальные клетки СВФ супрессируют пролиферацию Т- и В-лимфоцитов через NF- κ B-опосредованные пути.

Marigo J et al. Semin Immunopathol (2011) 33(6):593-602; Haubner F et al. Radiat Oncol (2013) 8(1):66; Benvenuto F et al. Stem Cells (2007) 25(7):1753-60.

Цитокины и адипокины, секретируемые клетками СВФ, действуют как хемоаттрактанты для моноцитов и макрофагов, стимулируя течение раневого процесса.

Forcheron F et al. PLoSOne (2012) 7(2):e31694; Lee MJ et al. J Proteome Res (2010) 9(4):1754-62; Kong D et al. Biomaterials (2013) 34(10):2501-15; Chen L et al. PLoSOne (2008) 3(4):e1886.



РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ

СВФ стимулирует ремоделирование грануляционной и фиброзной тканей, перестройку внеклеточного матрикса и эпителизацию

Нарушение выработки коллагенов I и III типов фибробластами за счет подавления экспрессии гена Col3a1 при культивировании в среде, кондиционированной стромальными клетками жировой ткани

Повышение экспрессии генов, отвечающих за выработку проколлагена I типа

Perlecan

Ohnishi S et al. FEBS Lett (2007) 581(21):3961-6; LeeSH et al. AnnDermatol (2012) 24(2):136-43.

Пракриная стимуляция эпителизации путем усиления миграции фибробластов и кератиноцитов.

HeoSC et al. J Invest Dermatol (2011) 121(7):1559-67; LeeSH et al. AnnDermatol (2012) 24(2):136-43; Rodriguez-Menocal L et al. StemCellsTranslMed (2012) 1(3):221-9; Walter M et al. ExpCellRes (2010) 316(7):1271-81; Nambu M et al. J TissueEng (2011) 2011:158105; GoñYY et al. Am J Pathol (2010) 177(6):2791-803; GreenbergerJS et al. SeminRadiatOncol (2009) 19(2):133-9; Bensidhoum M et al. J Soc Biol (2005) 199(4):337-41; François S et al. AnnHemato (2006) 85(1):1-8; Mouseddine M et al. Br J Radiol (2007) 80(SpecialIssue1):549-55.

Laminin Entactin

ПРИВЛЕЧЕНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

СВФ стимулирует миграцию эндогенных
стволовых клеток путем хоуминга по градиенту
хемокинов

Recruitment

Хоуминг эффект продемонстрирован для мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток – при системном введении клетки преимущественно накапливались в областях ишемического, воспалительного и некротического процессов.

Hübner F et al. PlastReconstrSurg (2012) 129(5):1081–92; Suga H et al. PlastReconstrSurg (2010) 126(6):1911–23; Greenberger JS et al. SeminRadiatOncol (2009) 19(2):133–9; Bensidhoum M et al. J Soc Biol (2005) 199(4):337–41; François S et al. AnnHematol (2006) 85(1):1–8; Mouseddine M et al. Br J Radiol (2007) 80(SpecialIssue1):S49–55; Zhang Y et al. CancerRes (2012) 72(20):5198–208.

Основным хемоаттрактантом для эндогенных стволовых клеток является SDF-1.

Differentiation

Chang P et al. Nature (2013) 4(6):e685; Ponomarev T et al. J ClinInvest (2000) 106(11):1331–9.

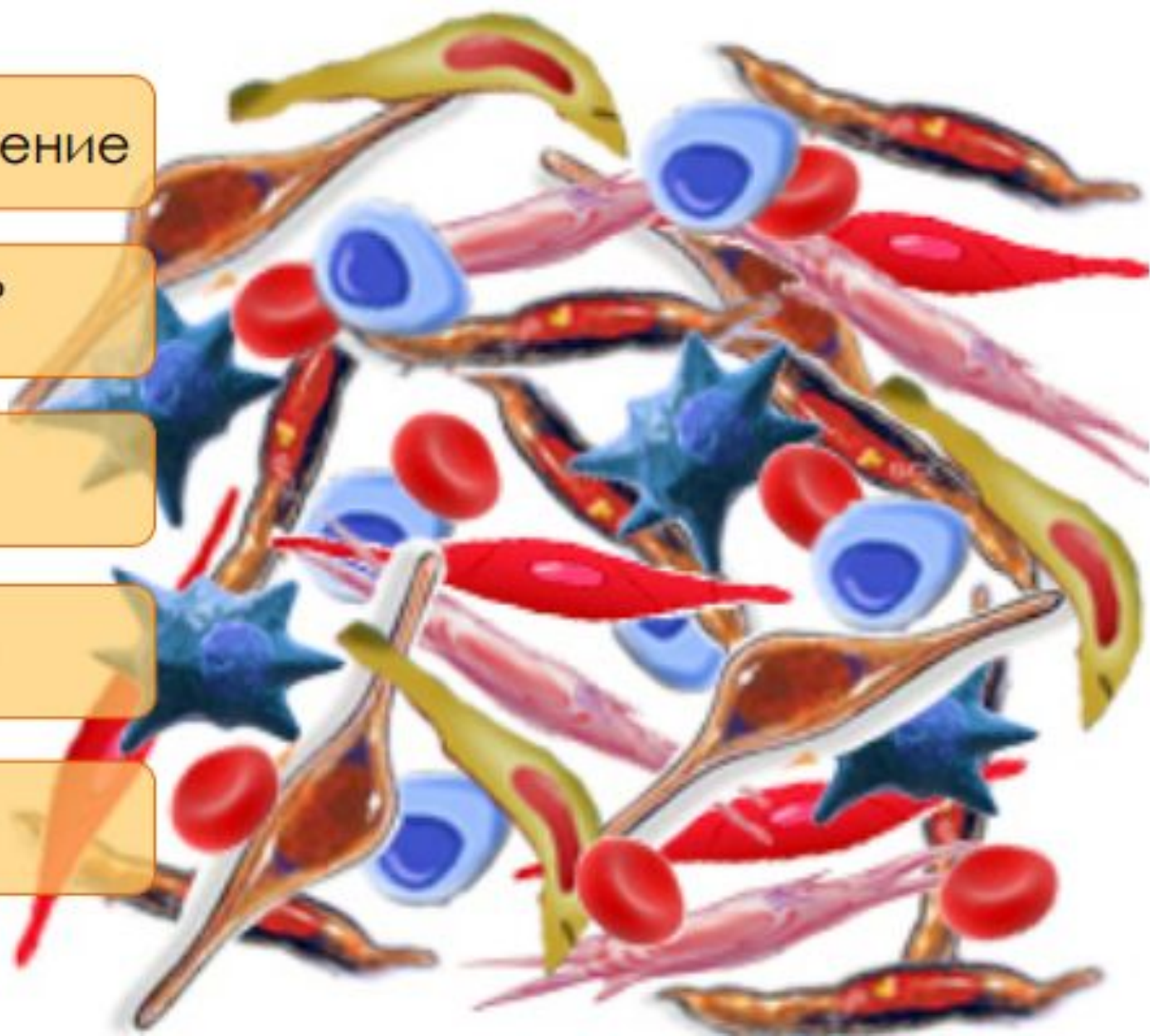
Острое и хроническое воспаление

Ишемия, недостаточность
кровообращения

Нарушения иннервации

Трофические нарушения

Фиброз



Остеоартроз

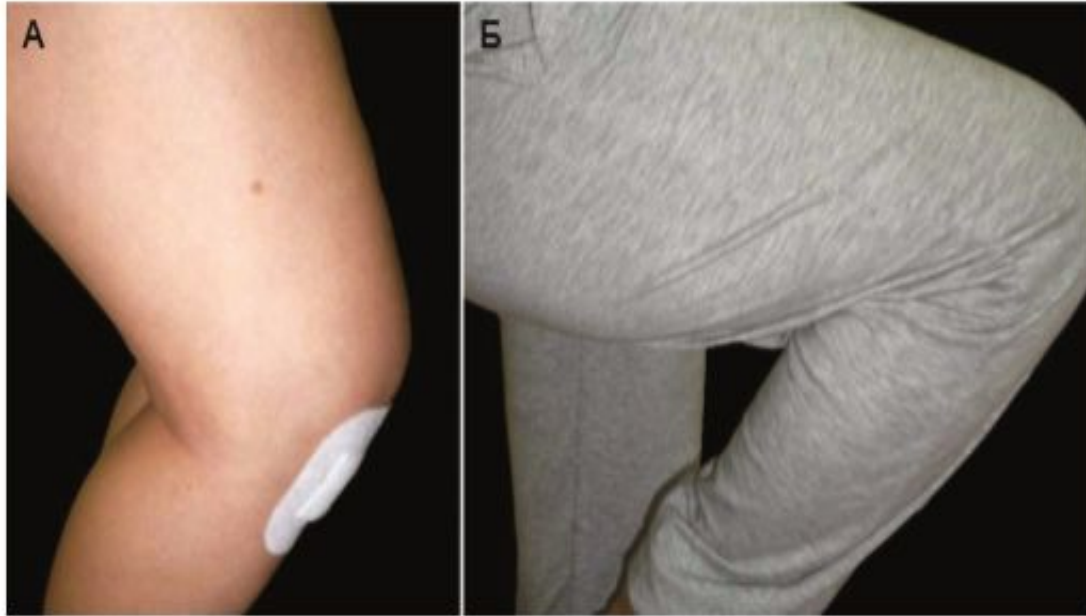


Рис. 3.
Пациентка М.
на следующий день
(А) и через 5 мес. (Б)
после операции

СВФ
+
Фибриновый
клей



Рис. 4.
Коленный сустав
пациентки М. через
5 мес. после
операции, уменьшение
субхондрального
отека, отсутствие
синовита

Тендиниты / Травмы СВЯЗОК

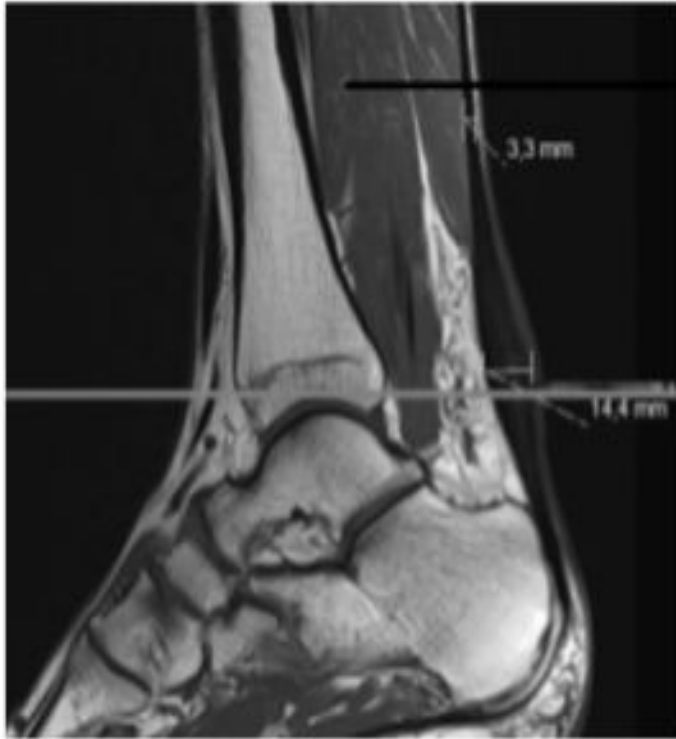


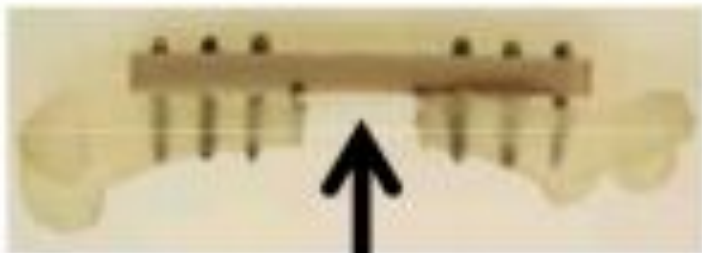
Рис. 1 До операции МРТ показывает места измерения в сагиттальной плоскости



Рис. 2 Послеоперационная МРТ показывает места измерения в сагиттальной плоскости

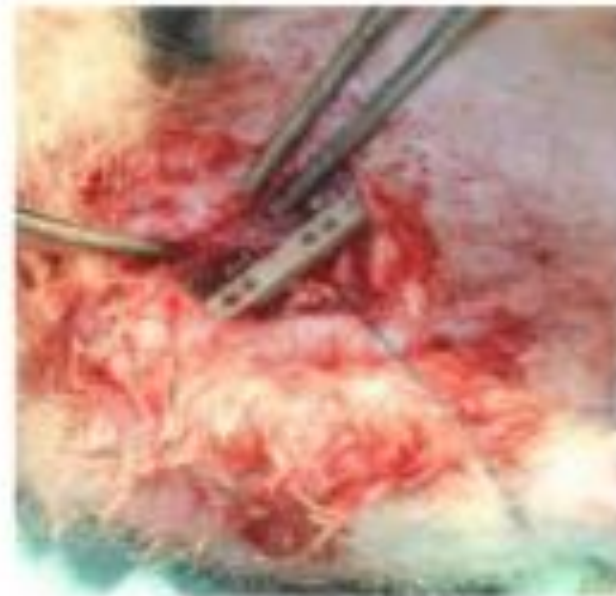
Наращивание костной ткани. В стоматологии Ортопедии

A



Cell-free or SVF-loaded
constructs

Martin et al, figure 1 R1TOP



НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ



Fig. 1 Collateral vessel formation and ulcer healing after SVF cell therapy. Case 1: digital subtraction angiography (DSA) images before (**A, C**) and after SVF cell injections (**B, D**). Collateral vessel formation was increased in the knee, upper tibia, and lower tibia at 7 months after SVF cell therapy (**B, D**). Ulcer before treatment (**E**) and completely healed ulcer at 5 months after SVF cell injections (**F**)

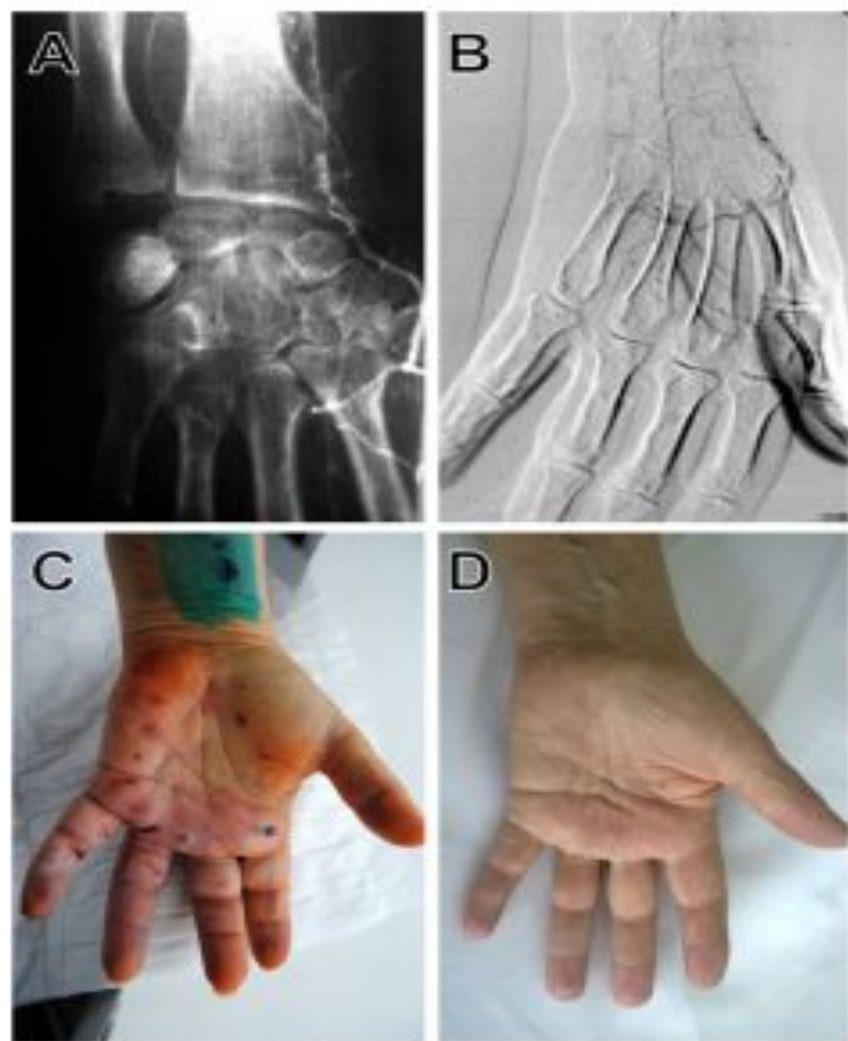


Fig. 2 Collateral vessel formation after SVF cell therapy. Case 6: DSA images before (A) and 10 months after SVF cell injections (B). Images of occluded limb right after SVF administration (C) and 10 months after SVF cell injections (D)



Fig. 3 Wound healing after SVF cell therapy. Case 11: non-healing ulcer before treatment (A) and completely healed ulcer at 2 months after SVF cell injections (B). Case 7: non-healing ulcer before treatment (C) and improved healing ulcer at 5 months after SVF cell injections (D)

Moreover, this study, for the first time, showed that injec-

Алопеци я



Ожог и



Ожоги лица 3б степени



К чему
приводит





Лечение СВФ



НИИ общей патологии
и патофизиологии
РАМН

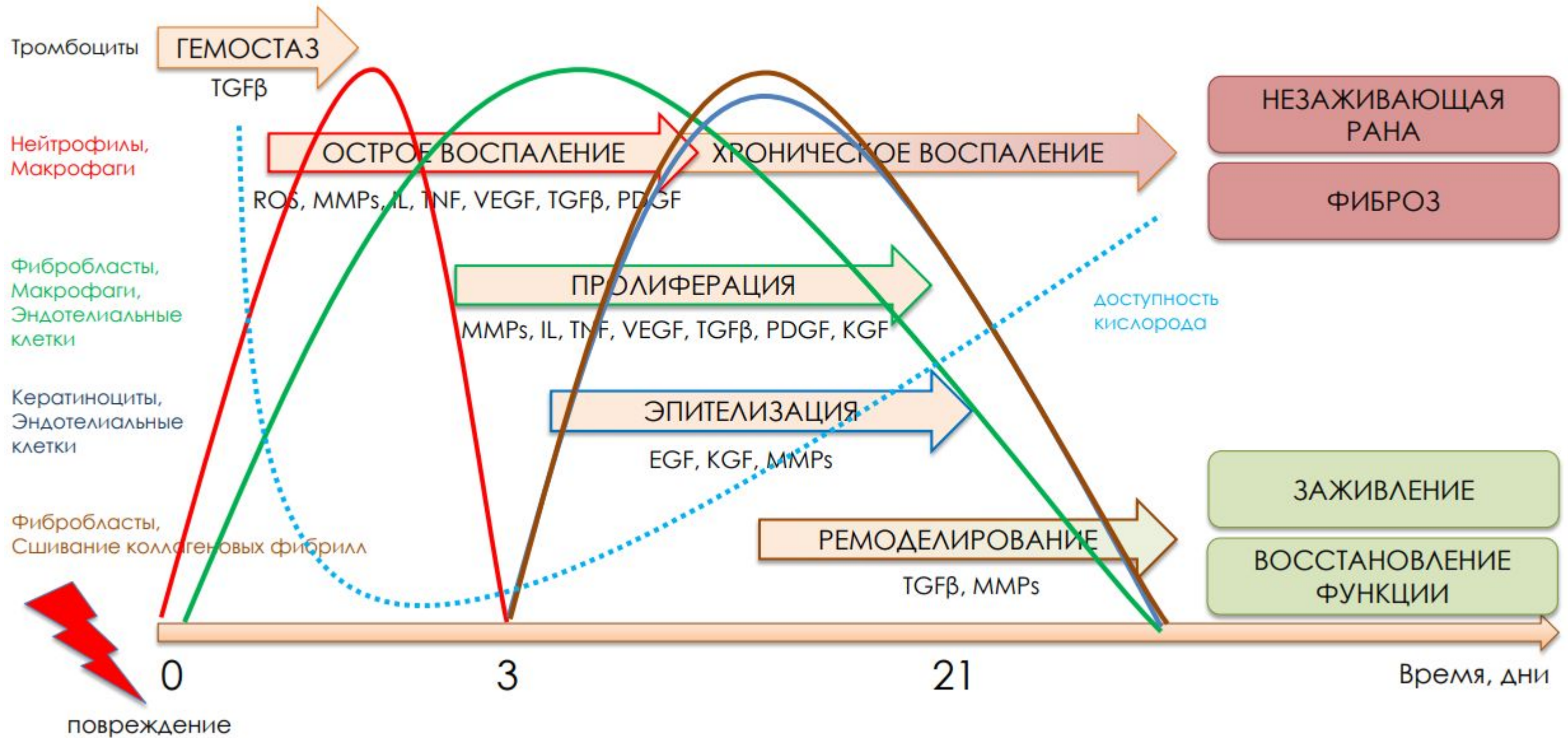


4,958 см² → 1,974 см²



4,867 см² → 0,58 см²

КОГДА ПРИМЕНЯТЬ СВФ?



Клеточная терапия

МСК плаценты и пупочного канатика

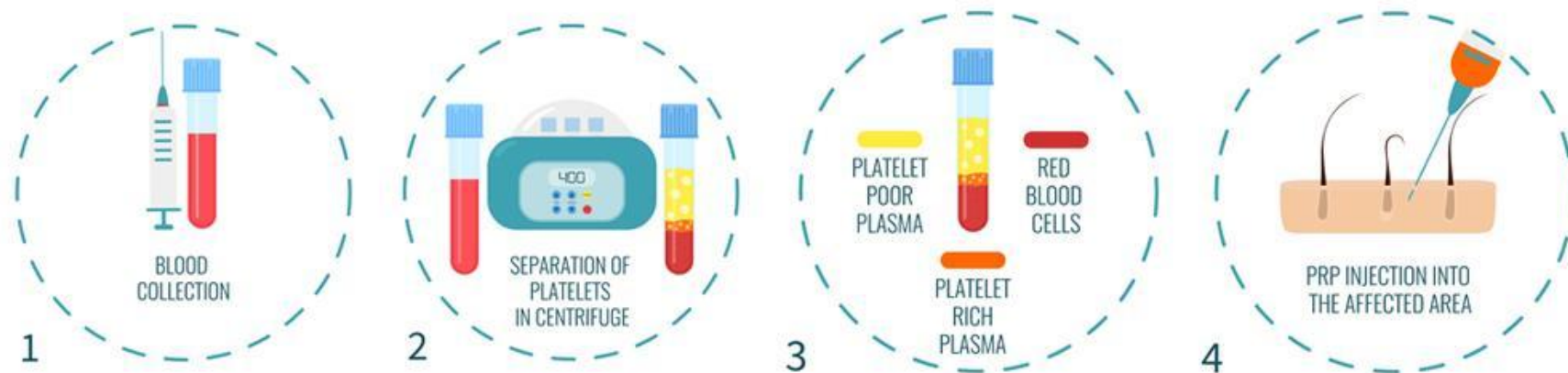
Доля клеток, экспрессирующих указанные поверхностные антигены в культурах МСК (2 пассаж), полученных из разных источников*

Источник МСК Антиген	Пупочный канатик	Жировая ткань	Костный мозг
CD90+	99,2 ± 0,5	99,3 ± 0,4	99 ± 0,4
CD 105+	89,7 ± 6,9	99 ± 0,8	93,3 ± 6,5
CD 73+	99,3 ± 0,7	98,2 ± 0,6	95 ± 3,2
CD 10+	37,8 ± 19,3	81 ± 13,5	98 ± 0,9
CD 13+	34,6 ± 15,7	97,3 ± 2,1	96,1 ± 1,9
CD 44+	99 ± 0,9	99,8 ± 0,05	97,5 ± 2,3
HLA-ABC	99,5 ± 0,2	99,8 ± 0,1	99,2 ± 0,1
CD 45-	3 ± 2,4	2,5 ± 1,2	1,9 ± 1,6
CD14-	3,8 ± 3,5	2,4 ± 1,6	1,5 ± 0,8
CD117-	4,2 ± 3,8	1,8 ± 0,5	1,1 ± 0,4
CD34-	2,1 ± 1,8	3,4 ± 2,1	3,1 ± 2,8

Аллогенны
е клетки

Богатая тромбоцитами плазма (БоТП)

PRP PROCEDURE



IGF(инсулиноподобный фактор роста), PDGF(тромбоцитарный фактор роста),
TGF-b(трансформирующий фактор роста), VEGF(фактор роста эндотелия сосудов),
EGF(эпидермальный фактор роста), FGF(фактор роста фибробластов)

Количество цитокинов ниже как и эффект в целом

ИПСК – Индуцированные Плюрипотентные Стволовые Клетки

нервной системы

Kikuchi T, Morizane A, Doi D. Human iPSC cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model. *Nature*. 548(7669):592-596. (2017)
Lee CT, Bendriem RM. 3D brain Organoids derived from pluripotent stem cells: promising experimental models for brain development and neurodegenerative disorders. *J Biomed Sci*. 24(1):59. (2017)
Ehrlich M, Mozafari S, Glatza M. Rapid and efficient generation of oligodendrocytes from human induced pluripotent stem cells using transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114(11):E2243-E2252. (2017)

сердечно-сосудистой системы

Yoshida Y, Yamanaka S. Induced Pluripotent Stem Cells 10 Years Later: For Cardiac Applications. *Circ Res*. 120(12):1958-1968. (2017)
Lin Y, Gil CH. Differentiation, Evaluation, and Application of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 37(11):2014-2025. (2017)

Генетические заболевания

лѐгких

Hansel MC, Davila JC, Vosough M. The Use of Induced Pluripotent Stem Cells for the Study and Treatment of Liver Diseases. *Curr Protoc Toxicol*. 67:14.13.1-14.13.27. (2016)
Takebe T, Sekine K, Kimura M. Massive and Reproducible Production of Liver Buds Entirely from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep*. 21(10):2661-2670. (2017)
Fiorotto R, Amenduni M, Mariotti V. Liver diseases in the dish: iPSC and organoids as a new approach to modeling liver diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 1865(5):920-928. (2019)

глаз

Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med*. 376(11):1038-1046. (2017)
Burnight ER, Gupta M, Wiley LA. Using CRISPR-Cas9 to Generate Gene-Corrected Autologous iPSCs for the Treatment of Inherited Retinal Degeneration. *Mol Ther*. 25(9):1999-2013 (2017)

сахарного диабета

Pan G, Mu Y, Hou L, Liu J. Examining the therapeutic potential of various stem cell sources for differentiation into insulin-producing cells to treat diabetes. *Ann Endocrinol (Paris)*. 80(1):47-53. (2019)

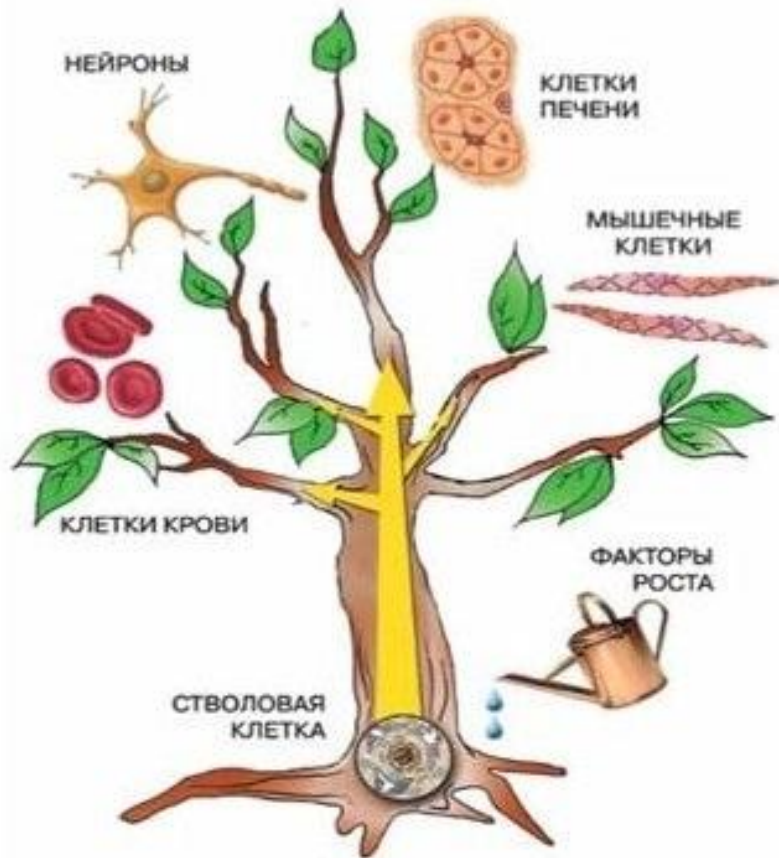
гематологических заболеваний

Elbadry MI, Espinoza JL, Nakao S. Disease modeling of bone marrow failure syndromes using iPSC-derived hematopoietic stem progenitor cells. *Exp Hematol*. 71:32-42. (2019)

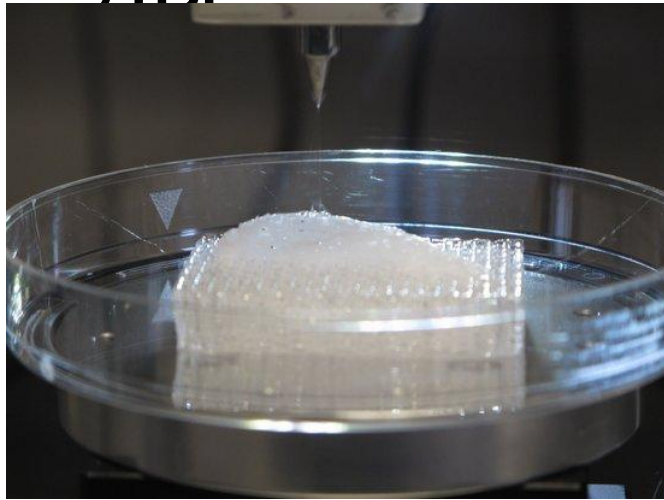
- Эксперименты:

1) по дифференцировке
ИПСК в разные
клеточные линии

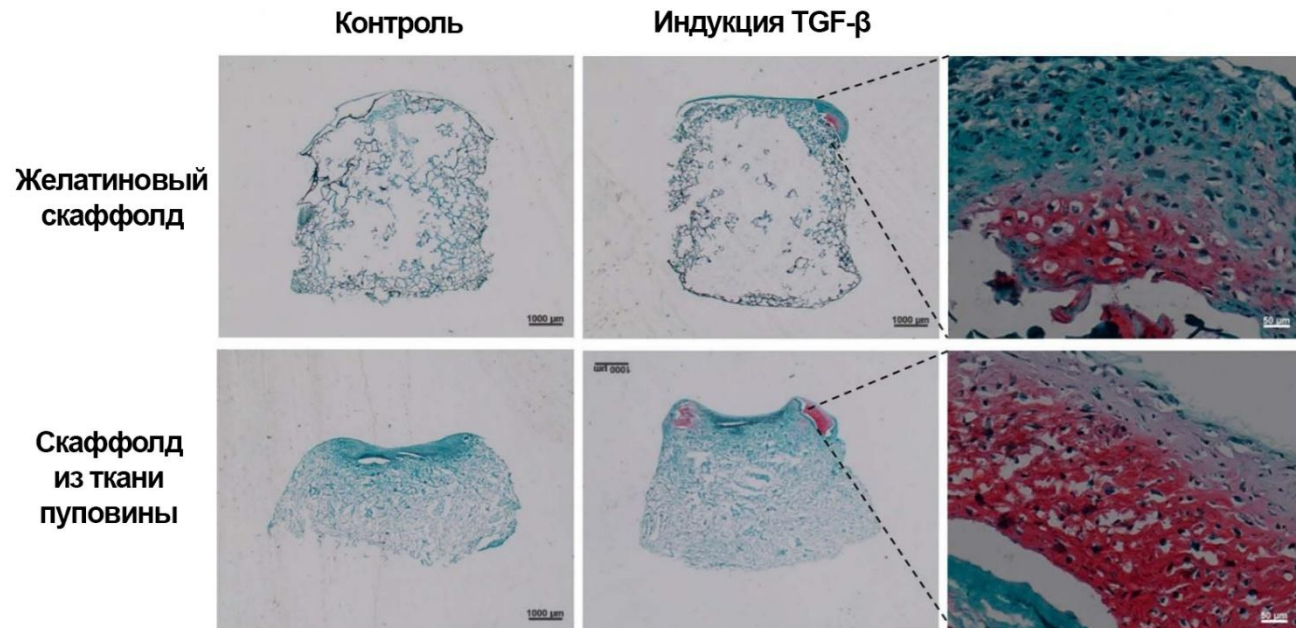
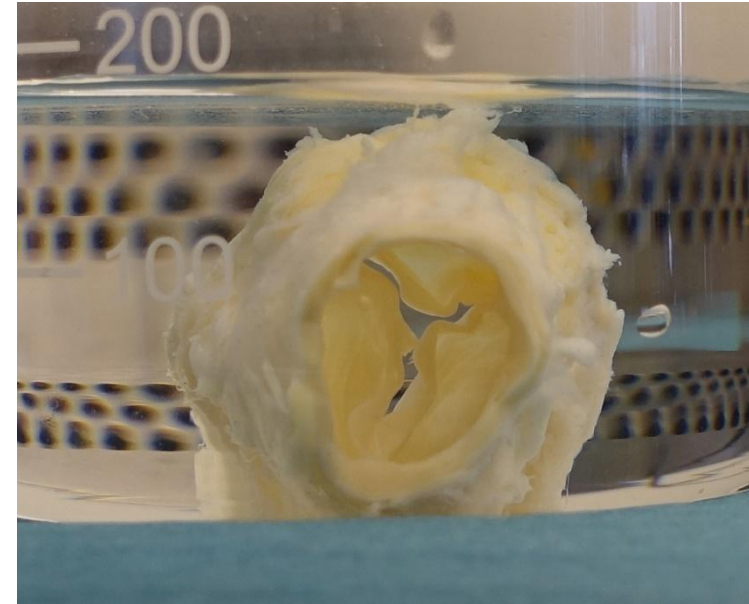
2) доклинические
исследования



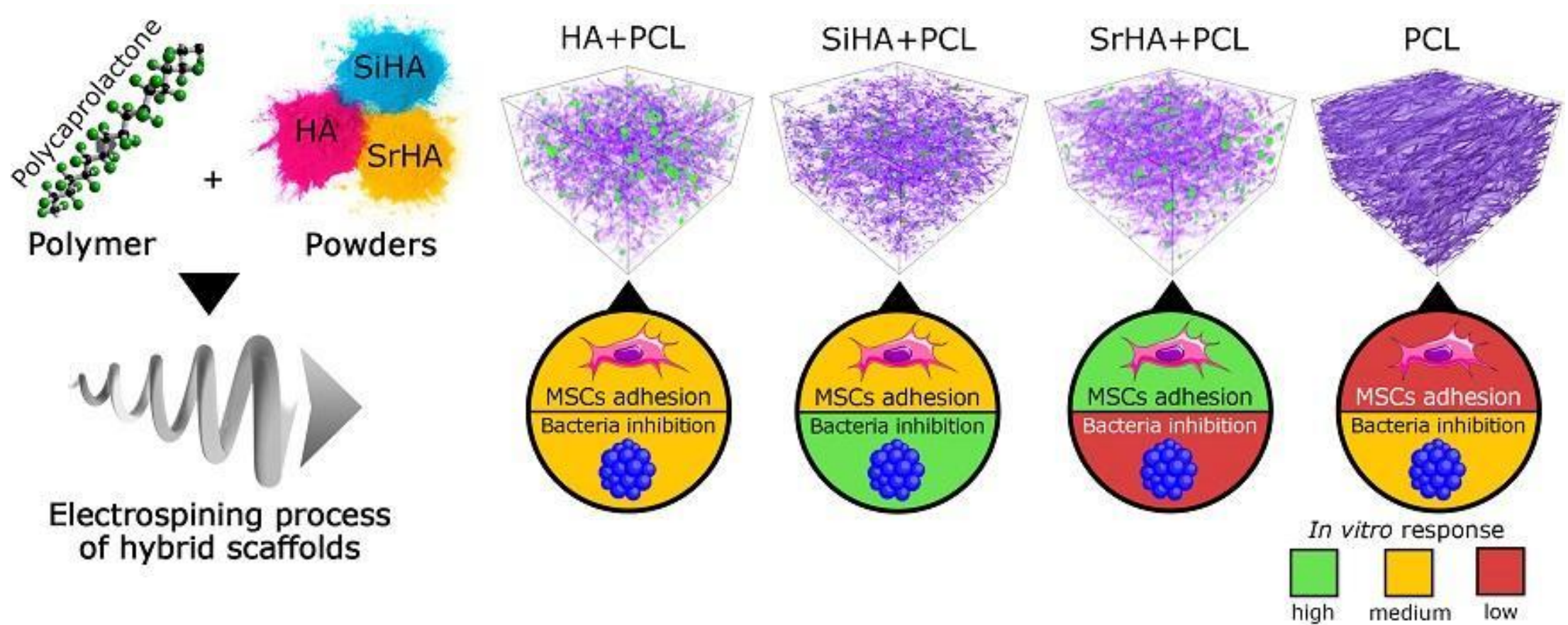
Скаффолды



Децеллюляризированные ткани и органы



Комбинация с клетками



**БЛАГОДАРЮ ЗА
ВНИМАНИЕ!**

Устинов Кирилл
Дмитриевич

kirillustinov1995@gmail.com