

Е.Е.Зуева, А.В.Куртова, Л.С.Комарова

**Стволовые клетки. Некоторые биологические особенности и терапевтические возможности.**

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет  
им.акад.И.П.Павлова

**Введение**

В настоящее время практические результаты исследования и применения стволовых клеток (СК) стали оказывать существенное влияние на жизнь многих пациентов и их семей. Международные эксперты полагают, что продолжение работ в области изучения СК может помочь более, чем половине больных, страдающих от различных, на сегодняшний день неизлечимых заболеваний, среди которых онкология и гемобластозы, ювенильный диабет, болезни сердечно-сосудистой системы, болезнь Альцгеймера, остеопороз, артриты и др. С каждым днем увеличивается число пациентов, для которых доказательства терапевтических возможностей СК уже стали реальностью.

Что такое стволовые клетки? Откуда они появляются и каковы биологические отличия стволовых клеток различного происхождения? Как превратить эти различия в преимущества при различных вариантах клинического использования СК? Каков потенциал СК для восстановительной медицины, и какие препятствия необходимо преодолеть, чтобы сделать их применение не только полезным, но и безопасным? Ответы на эти вопросы появляются только в условиях практического сотрудничества клинических и научно-исследовательских центров.

**Типы стволовых клеток**

Существует три основных типа стволовых клеток (СК): эмбриональные, герминогенные и соматические, или стволовые клетки взрослых ([таблица 1.doc](#)).

Основные типы стволовых клеток

Типы стволовых клеток	Диапазон возможностей	Область ответственности
Эмбриональные	предшественники для всех клеток взрослого организма	формирование целого организма
Герминогенные	предшественники яйцеклеток и сперматозоидов	репродукция
Соматические	предшественники клеток, способных к дифференцировке в зрелые функционирующие клетки	обновление нормальных тканей

Предназначение соматических СК тканей определяется потребностями организма и уровнем их коммиттированности. Поэтому популяция соматических СК тканей взрослого организма функционально неоднородна:

1. Соматические СК, не пролиферирующие в нормальных условиях;
2. Дифференцированное потомство СК тканей, или клетки-предшественники (КП), обладающие различной степенью детерминированности и принимающие участие в пролиферации и дальнейшей дифференцировке;
3. Тканевые КП, дающие начало окончательно дифференцированным клеткам паренхимы типы [5].

Молекулярные механизмы происходящей таким образом прогрессивной потери возможностей СК и приобретения их потомством все более дифференцированных функций до сих пор мало понятны ([ris1.doc](#)).

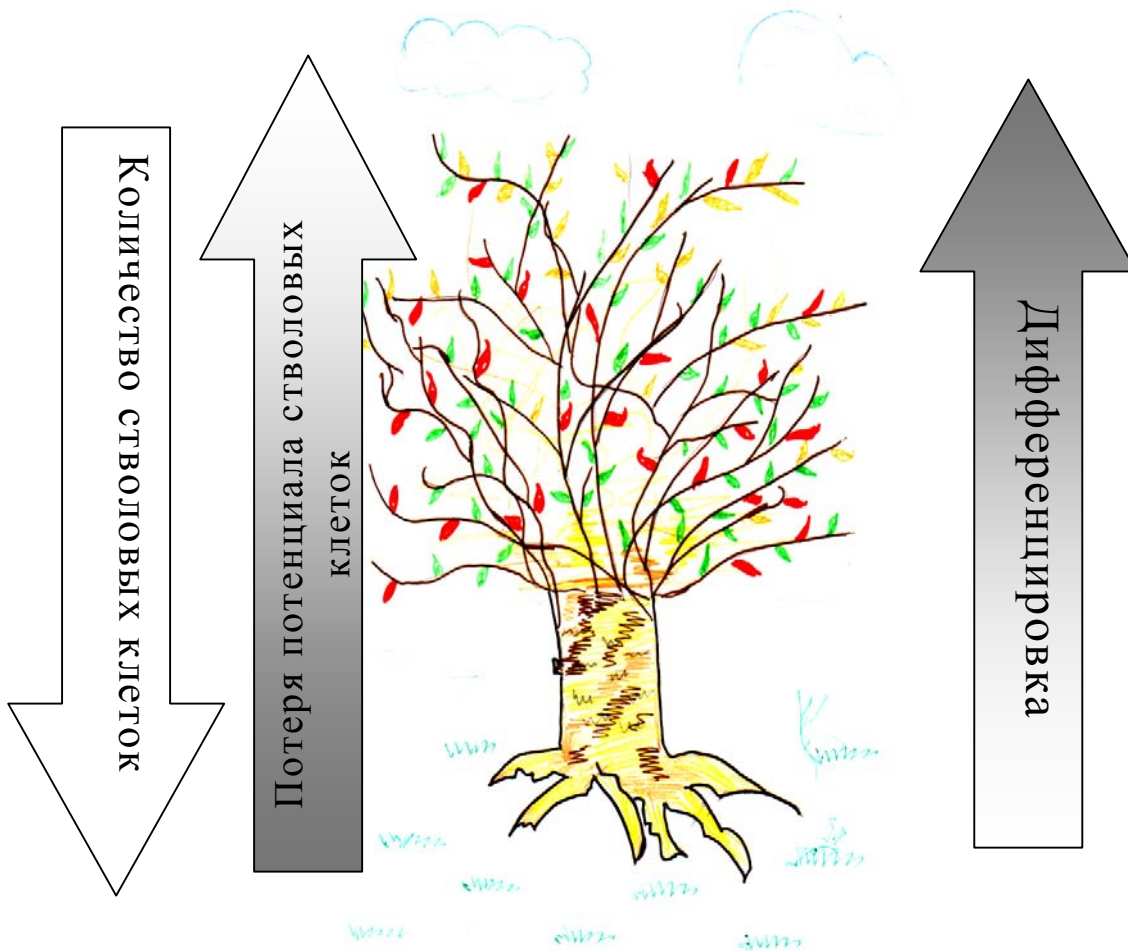


Рис. 1. Стволовые клетки соматических тканей и их роль в нормальном обновлении тканей. В стволе взрослого дерева существует очень небольшое количество СК, которые в обычных условиях во взрослом организме не пролиферируют. Коммиттированное потомство СК соматических тканей аналогично ветвям дерева: более многочисленно и обладает различной степенью детерминированности. Клетки-предшественники, подобно ветвям дерева, дают начало окончательно дифференцированным клеткам паренхимы, или листьям. В целом, от ствола к листьям происходит прогрессивная потеря возможностей СК и приобретение все более дифференцированных функций. Дальнейшая потеря возможностей делает клетку неспособной к выполнению ее предназначения и включает механизмы апоптоза, или листопада.

#### **Основные свойства стволовых клеток**

Диапазон биологических характеристик нормальных СК очень широк, но вне зависимости от принадлежности к тому или иному гистологическому типу их характеризует:

- 1) способность к самообновлению, что позволяет поддерживать пул недифференцированных СК в течение всей жизни;
- 2) способность к пролиферации, что необходимо для точной регуляции численности СК;
- 3) способность к восстановлению всех функционирующих элементов ткани.

Самообновление - это такое деление клеток, при котором одна или обе образующиеся дочерние клетки остаются недифференцированными и сохраняют способность к образованию других СК с такими же способностями к пролиферации, что и у родительских клеток. Пролиферация, в отличие от самообновления, не требует, чтобы образующиеся дочерние клетки обладали всеми особенностями СК, в том числе, способностью к формированию дифференцирующегося потомства. Предназначением коммиттированных КП является своевременное окончание пролиферации, что достигается снижением их пролиферативного потенциала с каждым делением. СК каждой ткани и коммиттированные КП отличаются друг от друга по способности к самообновлению, пролиферации и дифференцировке в конечные зрелые клеточные типы. В частности, получены доказательства, что нормальные коммиттированные КП гемопоэза способны поддерживать необходимый для взрослого организма уровень гемопоэза в течение 6-8 недель, а единичная гемопоэтическая СК может поддерживать систему крови в течение жизни хозяина [1, 2]. Этот удивительный потенциал является прямым следствием способности стволовой клетки к самообновлению [12].

#### **Деление стволовых клеток**

Различные типы СК обладают не только различным пролиферативным потенциалом, но и пролиферируют различным образом:

а) клетки могут делиться симметрично и в таком случае дочерние клетки сохраняют все характеристики родительских клеток;

б) клетки могут делиться асимметрично, и тогда одна клетка сохраняет все особенности родительской стволовой клетки, а другая становится более детерминированной. При асимметричном делении потеря одной из клеток некоторых возможностей СК компенсируется приобретением второй клеткой более дифференцированных характеристик ([ris2.doc](#)) [11].

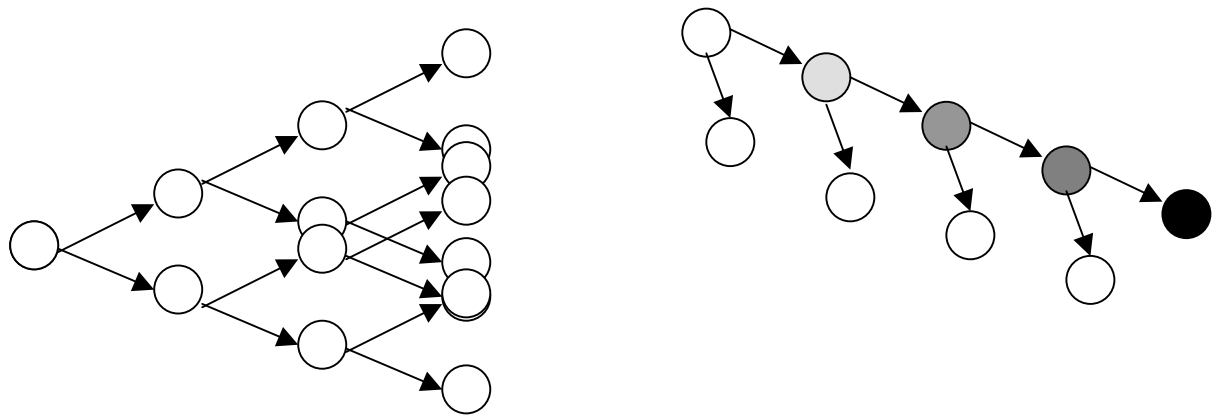


Рис. 2. Симметричное и несимметричное деление. При симметричном делении происходит логарифмическое нарастание количества дочерних клеток, идентичных друг другу и сохраняющих все характеристики родительской клетки. При несимметричном делении одна клетка остается стволовой, а другая становится более или менее детерминированной. Происходит линейное накопление количества клеток. В тканях взрослого организма потомство стволовой тканевой клетки становится все более дифференцированным (подвергается дифференцировке), частично сохраняя способность к пролиферации, и является основным источником восстановления тканей.

Для эмбриональных СК (ЭСК) во время раннего эмбрионального роста характерно симметричное деление, при котором происходит логарифмическое накопление массы клеток, а сами дочерние клетки остаются тотипотентными. В более поздние этапы эмбриогенеза, при закладке эмбриональных листков, ЭСК начинают делиться асимметрично. Потомство ЭСК постепенно теряет свой пролиферативный потенциал и приобретает характеристики дифференцированных тканей во время до сих пор плохо понятного процесса детерминации. Молекулярные механизмы асинхронного деления также не очень ясны. Существует предположение, что ДНК СК проходит через все деления таким образом, что новообразованная ДНК остается в клетках, подлежащих дальнейшей дифференцировке, а резервная ДНК сохраняется для самообновления пула стволовых клеток. Одним из возможных вариантов реализации асинхронного деления является анатомическая привязка в пространстве. Например, в герминогенных клетках один из полюсов асимметрично делящейся клетки прикреплен к окружающим клеткам с помощью таких молекул как кадгерин (cadherin) и бета-катенин ( $\beta$ -catenin). При делении одна дочерняя клетка остается прикрепленной к

клетке окружения и сохраняет свойства СК, а другая, неприкрепленная, начинает процесс дифференцировки ([ris3.doc](#)). Сигнал о том, какая дочерняя клетка сохранит статус стволовой клетки, а какая вступит на путь дифференцировки, передается различными путями [8]. Одним из них является фактор транскрипции Oct-4, экспрессируемый в норме на самых ранних этапах эмбриогенеза на внутренней массе клеток эмбриона, но не экспрессируемый теми частями трофобластической оболочки, которые предназначены для формирования экстраэмбриональных тканей. При дальнейшем нормальном развитии эмбриона экспрессия этого фактора транскрипции сохраняется только на клетках герминогенного ряда и расценивается как признак тотипотентности и способности к симметричному делению. Онкопротеин папилломавируса человека E7 специфически связывается с доменом промотора Oct-4, что приводит к активации экспрессии Oct-4 при вирусной трансформации. Диагностически высокий уровень экспрессии Oct-4 выявлен на клетках тератом, при терапии которых ретиноидами, вызывающими дифференцировку эмбриональных карцином, происходит значительное снижение уровня его экспрессии. Поиск/разработка лекарственных подходов для снижения уровня Oct-4 при тератомах основывается на возможностях дифференцировочной терапии, например, на основе использования ретиноидов, чья роль в дифференцировке и снижении пролиферативной активности лейкемических клеток уже доказана практикой [6].



Рис. 3. Вариант асимметричного деления. Один из полюсов асимметрично делящейся клетки прикреплен к клетке окружения. Одна дочерняя клетка остается прикрепленной к клетке окружения и сохраняет все характеристики исходной стволовой клетки. Вторая дочерняя клетка не связана с микроокружением и способна воспринимать дифференцировочные сигналы.

### **Пластичность стволовых клеток**

Практическим следствием способности СК к делению и дифференцировке является их пластичность, т.е. способность продуцировать потомство, которое может приобретать фенотипические черты зрелых клеток различных тканей. Термин

тотипотентность закреплен за клетками, которые могут служить источником как всех тканей организма, так и плаценты [7]. Термины плюрипотентность и мультипотентность с точки зрения диагностики являются синонимами, так как относятся к клеткам, способным приводить к появлению клеток, дифференцированных в самых разных направлениях. Они являются предшественниками для олигопотентных СК развивающихся органов. Во взрослом организме клетки, ответственные за обновление тканей, не являются тотипотентными, но, наоборот, рестрицированы в своих способностях формировать дифференцированные ткани. Единственным исключением из этого правила являются герминогенные клетки, опухоли из которых способны дифференцироваться во все ткани взрослого организма. Так, соматические КП бронхиального эпителия дают потомство, которое может становиться нейроэндокринными, мукозными или реснитчатыми клетками, а при патологических условиях могут трансдифференцироваться даже в ороговевающий эпителий. Гемопозитические и/или стромальные СК костного мозга в норме способны давать начало предшественникам самых разных клеток, включая эритроциты, тромбоциты, гранулоциты, моноциты, лимфоциты и даже эндотелиальные клетки. Интересно, что в костном мозге, коже и других интенсивно пролиферирующих тканях СК обычно не делятся и находятся в состоянии покоя, а обновление этих тканей осуществляется пролиферацией дочерних клеток, продолжающих процесс дифференцировки. Завершением этого процесса является появление окончательно дифференцированных клеток, таких как гранулоциты крови, ороговевающие эпителиальные клетки кожи. СК обладают способностью при определенных условиях дифференцироваться в ткани эктодермального, мезодермального и эндодермального происхождения. Основным источником роста, восстановления и регенерации соматических тканей в настоящий момент принято считать костный мозг, клетки которого, как было доказано в экспериментальных исследованиях, могут давать начало всем тканям таких органов, как сердце, легкие, кишечник, печень, кожа, мозг и др. И это является нормальным физиологическим процессом, постоянно протекающим в организме взрослого человека. Так как потенциал тканевых клеток предшественников костного мозга меньше, чем у тотипотентных клеток, но шире, чем у мульти/плюрипотентных клеток предшественников гемопозитического ряда, для их описания часто применяют термин плейопотентности. Таким образом, в течение всей жизни индивидуума в организме сохраняются СК, обладающие мультилинейным потенциалом дифференцировки, а

костный мозг (КМ) представляет собой резервуар плейопотентных стволовых клеток, которые могут покидать КМ и попадать в другие ткани.

### **Тканевые клетки предшественники и обновление/регенерация тканей**

Для млекопитающих, в том числе для человека, характерен относительно постоянный уровень потери стареющих клеток и возобновления их численности для выполнения конкретной задачи, определенной функции. Состояние равновесия между потерей и появлением новых клеток в каждой ткани (кожа, мышцы, кровь) зависит от ее особенностей функционирования, уровня обмена и потребностей организма (рост, ранения, кровопотеря, старение и др.). Клетки разных тканей обладают различным сроком жизни. Для одних клеток (например, эритроцитов) этот срок хорошо известен, длительность функциональной жизнедеятельности других не так очевидна (клетки нервной ткани, некоторые субпопуляции лимфоцитов). Для возобновления численности клеточной популяции и ее способности выполнять специализированные функции, образующиеся клетки должны развиваться из своих тканевых предшественников и безошибочно замещать своих предшественников. Это относится и к кардиомиоцитам, и к липоцитам, и к эндотелию сосудов. Следовательно, идея о наличии в каждой ткани клеток предшественников имеет не только подтвержденное фактами право на существование, но и теоретическое обоснование. Обновление нормальных тканей сопровождается асимметричным делением тканевых КП, при котором одна дочерняя клетка сохраняет свойства стволовой, а другая становится более детерминированной. В большинстве органов замещение окончательно дифференцированных клеток осуществляется при пролиферации клеток предшественников и их более детерминированного потомства. Более дифференцированное потомство при пролиферации увеличивает популяцию детерминированных клеток и дает потомство, способное давать максимально дифференцированные клетки, которые не пролиферируют и в конечном итоге умирают ([ris4.doc](#)).

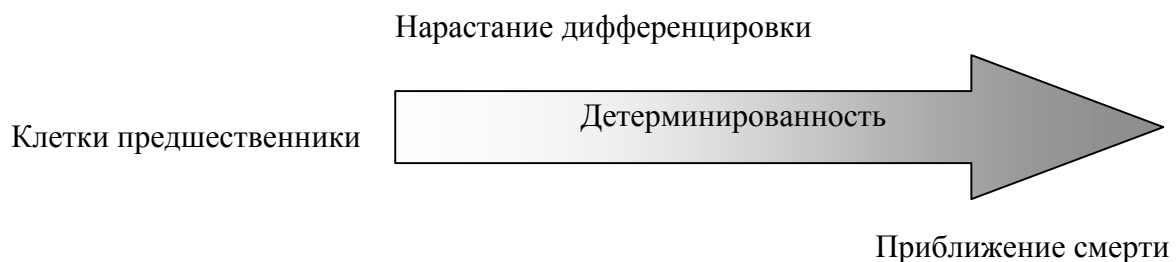
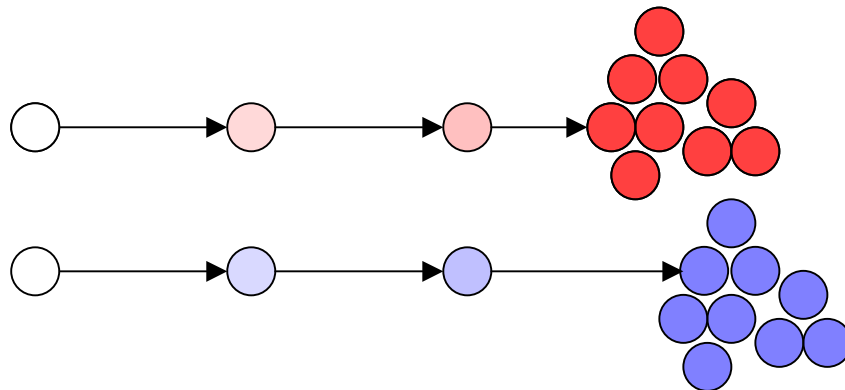


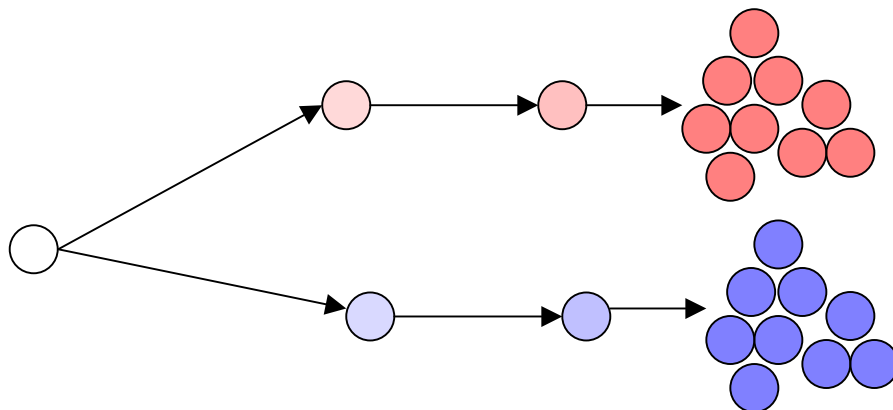


Рис.4. Соотношение детеминированности и дифференцировки.

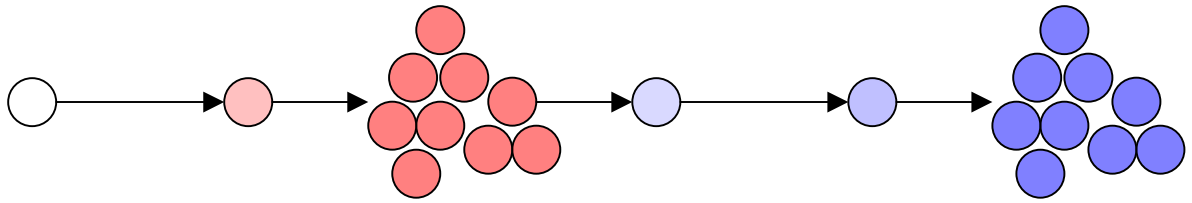
С точки зрения классической эмбриологии детерминация рассматривается как однонаправленный процесс. Термин «трансдифференцировка» описывает репрограммирование клетки, которая уже вступила на путь дифференцировки. Однако, в настоящее время доказано, что достаточно детерминированные тканевые клетки предшественники одной ткани способны дифференцироваться в зрелые, окончательно дифференцированные клетки другой ткани. Например, костный мозг взрослого человека содержит минимальное количество недифференцированных стволовых клеток, обладающих достаточной пластичностью для того, чтобы давать потомство, способное дифференцироваться в самые разные типы зрелых клеток в зависимости от микроокружения. Это превращение можно рассматривать не как трансдифференцировку, а скорее как пластичность, плейотропность возможностей ([ris5.doc](#)) [10].



Дифференцировка соматической стволовой клетки взрослого организма



Пластичность стволовой клетки взрослого организма



Трансдифференцировка клеток взрослого организма

Рис. 5. Возможности соматических стволовых клеток.

### **Стволовые клетки рака и лейкозные стволовые клетки**

Для поддержания функции ткани/органа на необходимом для организма уровне восстановление утраченных клеток должно не нарушать общую архитектуру. Клетки, вступающие в пролиферативную фазу жизненного цикла, более чувствительны к внешним мутационным воздействиям по сравнению с клетками в фазе  $G_0$  и в части случаев могут оказаться дефектными и перестать воспринимать сигналы регуляции нормального роста. Авария в делящейся клетке может привести к появлению потомства, которое не подчиняется определенному порядку и не обладает необходимыми механизмами репарации ДНК. Размножение такой клетки/клеток может привести к появлению патологического клона значительного размера, к появлению новообразования. Именно так обстоит дело со злокачественными опухолями, которые растут быстрее или медленнее в зависимости от ритма деления и продолжительности жизни составляющих их клеток.

Несмотря на клональное происхождение подавляющего большинства злокачественных опухолей, одной из наиболее известных особенностей первичных опухолей является значительная клеточная гетерогенность. И хотя сама эта характеристика многократно описана, тем не менее, причины, по которым единичная трансформированная клетка дает начало многим клеточным типам, составляющим опухоль, остаются неясными. Известно, что нормальные СК обладают потенциалом к самообновлению популяции, к экстенсивной пролиферации и к дифференцировке в различные клеточные типы. Исходя из этого, легко представить, что даже минимальные отклонения от этих характеристик могут привести к формированию феномена злокачественности. И действительно, на сегодняшний день получены доказательства участия СК в патогенезе некоторых видов злокачественных опухолей, в частности, миелолейкоза. Лейкозные стволовые клетки (ЛСК) обладают многими

характеристиками нормальных стволовых гемопоэтических клеток, и, следовательно, популяция злокачественных стволовых клеток может появляться двумя путями [3]:

- 1) одна возможность состоит в том, что нормальные гемопоэтические стволовые клетки оказываются прямой мишенью мутаций, приводящих к появлению фенотипа ЛСК.
- 2) согласно второй гипотезе, мутации в более дифференцированных клетках (олигопотентных КП) могут приводить к появлению характеристик стволовых клеток.

Вне зависимости от происхождения, возникающие тем или иным образом клетки, обладают уникальными чертами стволовых раковых клеток.

Среди стволовых клеток соматических тканей лучше всего изучены СК гемопоэза. Поэтому неудивительно, что феномен стволовых клеток опухоли подробнее всего изучен по данным огромного массива исследований лейкозов *in vivo* и *in vitro*. Идентифицированные при острой и хронической формах миелолейкоза, при остром лимфобластном лейкозе ЛСК обладают способностью к самообновлению популяции, пролиферации и дифференцировке. Характерная для нормального гемопоэза иерархическая структура построения ткани сохраняется и в лейкомической популяции клеток ([ris6.doc](#)). Опухоль из потомства пролиферирующих СК может развиваться в любом возрасте; а уровень дифференцировки опухолевых клеток зависит от стадии дифференцировки, на которой проявились онкогенные воздействия. Если запрет созревания происходит на ранней стадии дифференцировки клеточной линии, то развивается опухоль низкой степени дифференцировки. Если нарушение происходит позже, то и уровень дифференцировки опухолевой ткани выше. Изменения, ведущие к развитию рака, могут происходить в клетках, сохраняющих потенциал деления, например, в клетках, лежащих выше базального слоя мембраны кожи или слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта. Однако при функциональной сохранности ткани происходит физиологическое удаление нормальных и трансформированных клеток верхних слоев ороговевающего и неороговевающего эпителия. Следовательно, для развития онкологического заболевания необходимо, чтобы трансформированные клетки оставались внутри организма.

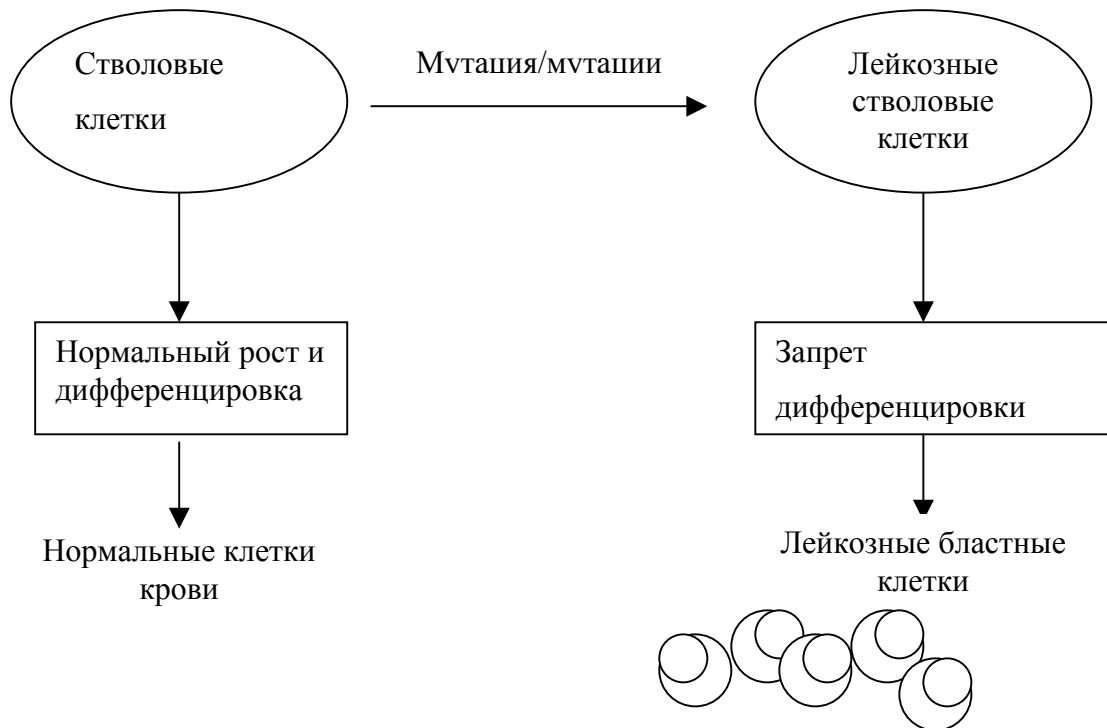


Рис. 6. Нормальные гемопоэтические стволовые клетки подвергаются мутации и дают начало ЛСК. ЛСК начинают процесс дифференцировки, но из-за запрета дифференцировки и неэффективности регуляторных воздействий происходит накопление клеток на промежуточной стадии развития. Такие клетки получили название лейкозных бластных клеток и биологически отличаются от ЛСК. В результате накапливается генетическая нестабильность и гетерогенность популяции, в которой одновременно сосуществуют лейкозные стволовые и бластные клетки.

С точки зрения лабораторной диагностики уровень дифференцировки означает степень сходства опухолевых и нормальных клеток аналогичных тканей по цитологическим и функциональным признакам. Отсутствие дифференцировки, или анаплазия означает стойкую утрату клеткой всех специфических функций за исключением способности к пролиферации. При диагностике различных вариантов острого миелобластного лейкоза (ОМЛ) в состав популяции лейкозных бластов входят ЛСК с однотипным иммунофенотипическим профилем ( $CD34^+CD38^-$ ). Они обладают способностью к самоподдержанию собственной популяции и находятся в состоянии покоя, как и их нормальные аналоги. Состояние покоя ЛСК означает, что химиотерапия, направленная на элиминацию активно пролиферирующих злокачественных клеток, а priori неэффективна по отношению к ЛСК ОМЛ. Именно

поэтому при лечении гемобластозов необходимо проведение многократных курсов антипролиферативной химиотерапии для уничтожения ЛСК. Даже при таких жестких условиях, не менее 30% пациентов нуждаются в проведении полной аблации костного мозга и трансплантации стволовых клеток здорового донора с тем, чтобы достигнуть уничтожения ЛСК и санации организма от опухолевых blastov. Преодоление возможности рецидивов лежит в области разработки и внедрения препаратов, токсичных для РСК. Так, для ЛСК ОМЛ доказанным цитотоксическим действием обладает продукт слияния дифтерийного токсина и молекулы ИЛ-3, изучение эффективности которого уже вступает в первую стадию клинических испытаний.

Аналогичные, находящиеся в состоянии покоя ЛСК были выявлены и при исследовании хронического миелолейкоза (ХМЛ). Опыт применения иматиниб мезилата (Гливек), высокоэффективного препарата для индукции ремиссии, только увеличил число доказательств того, что происходит подавление заболевания, а не его эрадикация. Культуральные исследования ЛСК ХМЛ, обработанных иматиниб мезилатом подтвердили, что препарат обладает цитостатическим, но не цитотоксическим действием. Следовательно, для гарантированной эрадикации опухолевой популяции необходима аблация/удаление ЛСК. Дальнейшие успехи в этом направлении возможны при понимании крайне сложных вопросов:

- 1) какие именно события приводят к превращению нормальной гемопоэтической стволовой клетки в ЛСК и
- 2) каковы механизмы роста и выживания популяции ЛСК.

В настоящее время детальные молекулярные механизмы трансформации гемопоэтических стволовых клеток ясны не до конца, но в большинстве случаев происходит нарушение способности к самоподдержанию популяции, увеличение пролиферативного индекса и доли клеток, выходящих из фазы  $G_0$ . Изменение частоты самообновления популяции стволовых клеток, т.е. нарушение нормального ритма самообновления ткани может приводить к появлению/накоплению клеток с патологическими характеристиками. Однако мы не можем экстраполировать данные о нормальных и трансформированных гемопоэтических стволовых клетках на другие виды рака.

Для онкологических заболеваний не гематологического происхождения также доказано существование опухоль-иницирующих клеток (ОИК), обладающих характеристиками ЛСК. Исследования последних лет подтвердили гипотезу существования стволовых или клеток предшественников, по крайней мере, для

некоторых видов рака. В частности, первичные опухолевые клетки метастатической формы рака молочной железы, не экспрессирующие линейных маркеров и обладающие фенотипом  $CD44^+CD24^{LOW}$  инициируют развитие опухоли после трансплантации иммунодефицитным мышам (NOD/SCID), в то время как введение других опухолевых клеток не приводит к развитию опухоли. Это подтверждает иерархичность строения опухоли, происходящей из редко встречающихся ОИК, фенотипически и функционально отличающихся от основной массы опухолевых клеток. Это означает, что ОИК рака молочной железы обладают (i) способностью к самообновлению популяции, (ii) к дифференцировке и (iii) обладают высоким пролиферативным потенциалом, т.е. отвечают всем критериям стволовых клеток и могут быть названы раковыми стволовыми клетками (РСК) [3]. По своей природе РСК отличаются от других клеточных представителей опухолей. Некоторые из этих особенностей увеличивают устойчивость РСК по отношению к стандартной химиотерапии и создают возможность рецидива за счет экспансии РСК данной опухоли. Преодоление возможности рецидивов лежит в области разработки и внедрения препаратов, токсичных для РСК. Так, для ЛСК ОМЛ цитотоксическим действием обладает продукт слияния дифтерийного токсина и молекулы ИЛ-3, однако публикаций о клиническом применении этой химерной молекулы в доступной нам литературе не найдено.

Вне зависимости от того, являются ли мишенью трансформации нормальные стволовые клетки или более зрелые клетки приобретают фенотипические черты злокачественных стволовых клеток, детальное рассмотрение биологических принципов на природу стволовых клеток необходимо для понимания патогенеза опухолевого процесса и создания стратегий более эффективных видов терапии.

### **Гемопоэтические стволовые клетки**

Одним из самых изученных примеров роли СК в развитии онкологического процесса являются онкогематологические заболевания [14]. Уже в 1917 году А.Паппенгейм постулировал наличие стволовых клеток крови, а в 1961 году была показана способность гемопоэтических клеток к формированию колонии после трансплантации в селезенку. Количество пролиферирующих колониеформирующих клеток минимально и составляет не более 0,05% от всего клеточного состава костного мозга, а количество покоящихся СК еще меньше. Тем не менее, гемопоэтические СК (ГСК) человека уже более тридцати лет применяют для восстановления гемопоэза

после миелоаблативной химиотерапии. Основными источниками ГСК в медицинской онкогематологии являются

1. Немодифицированные биологические материалы:
  - периферическая кровь (ПК);
  - костный мозг (КМ);
  - пуповинная кровь и
2. Клетки, тем или иным образом очищенные от гранулоцитов: в клинической практике таким модифицированным биологическим материалом чаще всего является продукт афереза мононуклеаров.

Большинство ГСК в костном мозге находятся в состоянии покоя и не пролиферируют, однако способны отвечать на стресс, кровопотерю, недостаток кислорода, т.е. на увеличение потребности в зрелых клетках крови. На сегодняшний день остается неясным, участвуют ли клетки-предшественники в нормальной циркуляции или освобождаются в костном мозге после получения гуморального сигнала. Основная масса ГСК экспрессирует молекулу CD34, выявляемую также на коммиттированных КП гематогенного и негематогенного происхождения. ГСК не экспрессируют маркеры линейной принадлежности (Lin<sup>-</sup>) и CD38, но позитивны по CD117 (c-Kit), CD133 и Thy-1. Для подтверждения отсутствия линейной коммиттированности (Lin<sup>-</sup>) необходимо исключить наличие экспрессии значительного количества линейно-ассоциированных маркеров ранних уровней дифференцировки. Очень небольшая доля ГСК негативна по CD34. ГСК человека также экспрессируют транспортный белок Vsrp1, не позволяющий проникать в клетку некоторым молекулам, включая Hoechst-33342. Это свойство ГСК позволяет осуществлять селекцию ГСК по отсутствию окрашивания Hoechst (проточная цитометрия). В зависимости от источника частота CD34<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> ГСК колеблется от 1:200 до 1:500. Невозможность выделить гомогенную популяцию ГСК делает необходимым оценивать их количество не только по фенотипическому профилю методом проточной цитометрии, но и с помощью функциональных исследований. Определение количества ГСК, их пролиферативного потенциала и способности к дифференцировке в миелоидном, В- и Т-лимфоидном направлении оценивается при длительном культивировании. Тем не менее, способность ГСК к хомингу и соревнованию с ЛСК за репопуляцию костного мозга пока практически невозможно оценить *in vitro*, и она определяется уже собственно результатами трансплантации. Успешность трансплантаций ГСК (ТГСК) во многом

определяется количеством CD34<sup>+</sup> клеток, инфузируемых пациенту. В настоящее время учет функционально активных ГСК осуществляется по колониеобразующей способности культуральными методами и по экспрессии маркера CD34 с помощью проточной цитометрии. Однако, 10-14-дневный интервал, необходимый для получения результатов культурального исследования существенно затрудняет его использование для планирования афереза и серьезно ограничивает контроль качества трансплантата, если результаты нужны срочно. Разнообразие биологических веществ, используемых даже в пределах одной лаборатории (тип колониестимулирующего фактора, лот эмбриональной телячьей сыворотки и т.п.), субъективность интерпретации (микроскопия) и отсутствие стандартизированной процедуры контроля качества существенно влияют на конечные результаты. Мультипараметрическая проточная цитометрия позволяет быстро и качественно проводить количественное определение ГСК в костном мозге, периферической и пуповинной крови, продукте афереза мононуклеаров. Содержание ГСК в трансплантате при планировании аутологичной и аллогенной, родственной и неродственной трансплантаций стандартно осуществляется методом проточной цитометрии согласно рекомендациям International Society of Chemotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) и основана на выявлении CD34<sup>+</sup> клеток среди других жизнеспособных ядродержащих клеток гематогенного происхождения (CD45<sup>+</sup>). При использовании проточной цитометрии количественное определение ГСК осуществляется за счет выделения клеточных популяций методами программного обеспечения (например, логического ограничения, или гейтирования), а не физического воздействия на биологический материал (например, градиентного центрифугирования). Высокая точность и минимальное время получения результатов количественной оценки ГСК периферической крови в день проведения афереза и в самом аферезном продукте требуют корректного использования технологий проточной цитометрии [13]. К сожалению, существенные расхождения в вариантах модификации CD34-позитивных клеток в различном биологическом материале связаны не только с техническими проблемами, разнообразием используемых протоколов пробоподготовки и анализа данных, но и тем, что такие протоколы применяются далеко не всеми центрами заготовки (анализа) ГСК для клинических целей. Использование различных реагентов и стратегий гейтирования, равно как и различных устройств для подсчета количества ядродержащих клеток (камера Горяева, гемоцитометры) оказывает влияние на величину межлабораторных расхождений (вариаций) [9].



Абсолютное количество CD34<sup>+</sup> клеток, или концентрация CD34<sup>+</sup> клеток в единице объема, расчетная величина количества CD34<sup>+</sup> клеток на килограмм массы тела реципиента являются наиболее широко используемыми в клинике показателями качества трансплантата как источника ГСК. Широкое распространение ТГСК происходит при отсутствии единого, стандартного протокола количественного определения CD34<sup>+</sup> клеток. За последние 10 лет общепринятое количество CD34<sup>+</sup> клеток, необходимое для трансплантации, снизилось с  $10 \times 10^6/\text{кг}$  до  $2-2,5 \times 10^6/\text{кг}$ , хотя и по последней цифре нет окончательной ясности. Введение меньшего количества ГСК ( $0,5-2,0 \times 10^6/\text{кг}$ ) не только приводит к более медленному восстановлению нейтрофилов и тромбоцитов, но и к более медленному приживлению трансплантата. Однако и преимущества введения значительно большего количества CD34<sup>+</sup> клеток, ( $> 5,0 \times 10^6/\text{кг}$ ) при аутологичных ТГСК не всегда очевидны. Проблема доступности ГСК очень актуальна, так как не менее 75% больных острым лимфобластным лейкозом с высоким уровнем риска не имеют HLA-совместимых сиблингов [4]. Альтернативными источниками для ТГСК являются совместимые неродственные доноры, неродственная пуповинная кровь и гаплоидентичные по HLA члены семей. Вероятность найти донора в добровольных международных регистрах, включающих на 2004 год более 8 миллионов потенциальных добровольцев, ограничена частотой встречаемости аллелей HLA и временем, необходимым для идентификации донора из возможной панели, установлением соответствия и собственно получением клеток. Среди взрослых реципиентов неродственных ТГСК бессобытийная выживаемость достигает 50% и рассчитана только на тех пациентов, которые получили ТГСК, не принимая во внимание тех, кому донор подобран не был. Для тех пациентов, у кого нет совместимого донора или кто срочно нуждается в ТГСК, внимание должно быть обращено на альтернативные источники ГСК, одним из которых является пуповинная кровь. Трансплантация неродственной пуповинной крови обладает такими преимуществами, как простота получения, отсутствие риска для донора, низкий риск передачи трансмиссивных инфекций, немедленная доступность криоконсервированных образцов, приемлемость несовместимости по двум-шести антигенам HLA.

Одной из нерешенных задач трансплантологии СК является увеличение их количества до введения в организм пациента, что могло бы позволить:

- 1) сократить время гематологического восстановления после химиотерапии или трансплантации;

- 2) увеличить количество долгоживущих КП в небольших по объему трансплантатах, таких как пуповинная кровь или кровь пациентов, длительно получавших ранее агрессивную химиотерапию;
- 3) удалять опухолевые/лейкозные клетки из трансплантата;
- 4) проводить генетические модификации долгоживущих ГСК.

Расширение показаний к проведению высокодозной химиотерапии естественным образом увеличивает количество пациентов, которым планируется проведение аутологичной ТГСК как дополнительной, адъювантной терапии. Это, в свою очередь, требует всесторонней качественной и безопасной оценки ГСК, является причиной появления международных программ контроля качества ([\table2.docT](#)) и является причиной развития такой области диагностической службы как лаборатория стволовых клеток.

Таблица 2

Организации, проводящие мультицентрические исследования по определению абсолютного количества CD34<sup>+</sup> методом проточной цитометрии

Организатор	Год начала проведения/публикации отчетов
BD Biosciences	1997
Canadian QASE (Quality assurance of stem cell enumeration) Study Group.	1997
UK NEQAS, National External Quality Assessment Scheme	1998
SIHON, Stichting Immunophenotyping Hematologische Oncologie Nederland	1985
BEST, Biomedical Excellence for Safer Transfusion Working Party	2001
AOR-STG, American Oncology Resources Stem Cell Group	1997
EWGCCA, European Working Group on Clinical Cell Analysis	2000

Возрастающая рутинность технологий, применяемых для оценки количества ГСК, различные манипуляции *ex vivo*, требования к безопасности проводимых исследований естественным образом относят исследования стволовых клеток к области трансфузиологии. На сегодняшний день происходит соединение разных областей трансплантологии, вплоть до поиска возможности замены одного вида трансплантации другим с тем, чтобы, получая идентичный (или сопоставимый) результат максимально снизить риск пациента. В частности, нарушение архитектоники сердца со снижением фракции выброса до 15-20% является в некоторых странах показанием для трансплантации сердца как органа. Однако, работами последних лет было показано, что аналогичный лечебный эффект может быть получен при трансплантации аутологичных ГСК, полученных из собственного костного мозга пациента. Тем не менее, в настоящее время количество трансплантаций ГСК при лечении онкологических, в том числе онкогематологических заболеваний, намного превосходит их использование при заболеваниях другого генеза.

#### Список литературы

1. Akashi K., Traver D., Miyamoto T., Weissman I.L. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages // *Nature* 2000, 404:193-195.
2. Akashi K., Weissman I.L. *Developmental Biology of Hematopoiesis*. Edited by Zon LI: New York: Oxford University Press; 2001.
3. Al-Hajj M, Wisha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells // *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100:3983-3988.
4. Aversa F., Reisner Y., Martelli M.F. Hematopoietic stem cell transplantation from alternative sources in adults with high-risk leukemia // *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. – 2004. – V.33. – P.294-302.
5. Bixby S., Kruger G.M., Mosher J.T., Joseph N.M., Morrison S.J. Cell-intrinsic differences between stem cells from different regions of the peripheral nervous system regulate the generation of neural diversity // *Neuron* 2002, 35:643-656.
6. Graham SM, Jorgensen HG, Allan E, Pearson C, Alcom MJ, Richmond L, Holyoake TL Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 *in vitro* // *Blood* 2002, 99:319-325.

7. Rao M.S. Stem sense: a proposal for the classification of stem cells // Stem Cells and Development 2004;13:452-455.
8. Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. Critical reviews in Oncology Hematology 2004, 51:1-28.
9. Warkentin P.I., Nock L., Shpall E.J. FAHCT accreditation: common deficiencies during on-site inspections // Cytotherapy. - 2000. – 2(3):213-220.
10. Wurmser A.E. & Gage F.H. Stem cell: cell fusion causes confusion // Nature. – 2002. – V. 416. – P.485-487.
11. Yamashita YM, Jones DL, Fuller MT. Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome // Science 2003;301:1547-1550.
12. Введение в молекулярную медицину. Под редакцией М.А.Пальцева. - М.ОАО «Издательство «Медицина»», 2004.-496 с.: ил.
13. Зуева Е.Е., Молчанова И.В., Комарова Л.С, Куртова А.В., Бабенко Е.В., Эстрина М.А., Фрегатова Л.М., Афанасьев Б.В., Тоголян А.А. Особенности количественного определения гемопоэтических стволовых клеток методом проточной цитометрии // Молекулярная медицина.-2005 (в печати).
14. Клиническая онкогематология: руководство для врачей. Под ред. М.А.Волковой. - М.: Медицина, 2001. – 576 с.