

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Л.І. Симонова,
А.А. Сколожабський,
В.З. Гертман,
Л.В. Білогурова

*Інститут медичної радіології
ім. С.П. Григор'єва
АМН України,
м. Харків*

Можливості застосування стовбурових клітин у медицині при радіаційних ураженнях організму

Possibility to use stem cells in radiation lesions
of the organism

В останні десятиріччя значно зріс та стійко зберігається підвищений інтерес до можливостей використання стовбурових клітин (СК) у різних галузях медицини. За допомогою спеціальних стимуляторів СК можуть трансформуватися в нейрони, клітини печінки, кісткової тканини, підшлункової залози, міоцити, тобто мають здатність утворювати нові пули практично всіх видів клітин. Медицина майбутнього тісно пов'язана з проблемою лікування стовбуровими клітинами. Вивчення і розвиток цього напрямку може принципово змінити технології лікування багатьох хвороб, причому СК розглядатимуться як основний пластичний матеріал. Завдяки СК створюється можливість регенерації тканин з відновленням їх функції.

У клітинній терапії сформувався новий напрямок досліджень — «біологія стовбурової клітини», завдяки якому в різних галузях медицини вже досягнуті певні успіхи. Так, у деяких публікаціях наводяться відомості про успішне застосування трансплантації СК при тяжких порушеннях гемопоезу: променевих ушкодженнях кровотворних органів (променева хвороба); розвитку мієлодепресій у процесі променевої терапії онкологічних захворювань [1, 2]; хемо- і променевої терапії системних захворювань крові [2–4]. Крім того, клітинна терапія одержує все ширше застосування як метод лікування серцево-судинних захворювань (інфаркту міокарда, інсульту, кардіомопатій, атеросклерозу) [5–8]; захворювань нервової системи (хвороби Паркінсона, Альцгеймера, церебральних паралічів,

розсіяного склерозу [9, 10]; інсулінозалежного діабету, цирозу печінки, аутоімунних захворювань, імунодефіцитів, колагенозів [11–16] та деяких інших.

Термін «стовбурова клітина» було введено 1910 р. професором Санкт-Петербурзької Військово-медичної академії А.А. Максимовим [17] саме для визначення кровотворної клітини з кісткового мозку, яку він вважав попередницею всіх клітин крові. У 60-ті роки стало можливим виділити та охарактеризувати кровотворні стовбурові клітини кісткового мозку (СККМ) і до теперішнього часу існує більш ніж 40-річний досвід застосування цих клітин для лікування мієлодепресій різного генезу [17, 18].

Найперші спроби використання СК були зроблені для відновлення кровотворення при променевій хворобі [17, 19–22]. У класичній радіобіології майже одночасно зі з'ясуванням ролі кісткомозкового синдрому, як основної причини загибелі опроміненого організму, почалися спроби лікування опромінених експериментальних тварин трансфузіями кісткового мозку [19]. Перші спроби такого роду закінчилися без успіху у зв'язку з відсутністю знань про імунологічну сумісність тканин. Згодом було запропоновано багато методів подолання тканинної несумісності, як в експериментах, так і в клініці [20, 23]. Проте дотепер проблема гістосумісності залишається однією з найгостріших у трансплантології і пошук її розв'язання триває.

Відновлення порушеного кровотворення є актуальним питанням не тільки для радіобіології, але й для онкології при лікуванні систем-

них захворювань крові та при лікуванні со-
лідних пухлин. Сучасні інтенсивні методи про-
типухлинного лікування (високодозна хемо-
і променева терапія) часто призводять до при-
гнічення кістковомозкового кровотворення. У
хворих протягом протипухлинного лікування
розвивається глибока мієлодепресія, яка, за
літературними даними [24–29], успішно ку-
пірується введенням СК.

Найбільш вражаючі позитивні результати
досягнуті при застосуванні СК в онкогемато-
логії, тобто при лікуванні різних гемобластозів.
Проведено вже більше 100 тис. операцій з
пересадженням стовбурових гемопоетичних
клітин при лікуванні лейкозу і лімфом [4, 30–
33]. Основним показанням до пересаджен-
ня гемопоетичних СК є необхідність віднов-
лення нормального кровотворення, порушено-
го злякисним захворюванням або інтенсив-
ною і надінтенсивною променевою та хемоте-
рапією.

Деякі спостереження доводять, що переса-
дження СК при онкологічних захворюваннях
виконує не тільки замісну функцію у кровотвор-
них органах, але може надавати одночасно
протипухлинну дію [34–36]. Більшість робіт
щодо застосування СК у онкологічних хво-
рих спрямована на їх реабілітацію у період
ремісії і в перервах між курсами хемо- і про-
меневої терапії, що дозволяє інтенсифікува-
ти антибластомне лікування з мінімальними
ускладненнями.

Вирізняють такі категорії стовбурових
клітин: ембріональні СК (ЕСК); фетальні СК;
СК з пуповинної крові (кордові); СК дорос-
лої людини (ДСК) [37]. Джерела отримання
цих видів СК бувають різними. З ембріо-
нальних тканин на стадії бластоцисти (5-й
день внутріутробного розвитку) одержують
ЕСК. Ці клони здатні диференціюватися аб-
солютно в будь-яку клітину дорослого орга-
нізму. Разом з тим, використання ембріональ-
них СК викликає ряд проблем [38]. Не зав-
жди можна добитися спрямованої прогнозо-
ваної проліферативної активності цих плю-
рипотентних клітин *in vivo*, при цьому зали-
шається неконтрольованою небезпека виник-
нення новоутворів. Доти, поки не буде виді-
лена безпечна лінія ЕСК, цей вид СК прак-

тично в усіх країнах буде заборонений для
клінічного використання.

Фетальні СК одержують з печінки плоду 9–
12-тижневого віку. Починаючи з 6-го тижня
розвитку плоду людини і до народження пе-
чінка є основним кровотворним органом [11,
38, 39]. Тільки на 18-й тиждень ембріогене-
зу починається гемопоез у кістковому мозку; до
13-го тижня розвитку відсутній тимус, відпо-
відно, Т-лімфоцити, тому ембріональні клітини
печінки 6–12-го тижнів гестації при транс-
плантації не викликають імунних реакцій у ре-
ципієнта і не вимагають підбору гістосумісно-
го донора [38–40]. На думку ряду авторів,
трансплантація клітин ембріональної печін-
ки є оптимальним варіантом клітинної терапії,
як для відновлення гемопоезу, так і для ліку-
вання інших захворювань [38, 39, 41]. Проте
законодавства багатьох країн забороняють
роботу і трансплантацію СК із абортивного
матеріалу і зародків з етичних і юридичних
міркувань, оскільки фінансова винагорода
може стати стимулом для абортів і навмисного
знищення людського плоду.

Плацентарно-пуповинна (кордова) кров є
найдешевшим і найбезпечнішим джерелом
СК. Слід зазначити, що кордова кров від-
різняється невисоким вмістом СК. В даний
час банки плацентарної крові створюються в
багатьох країнах, де одержана кров у консер-
вованому вигляді зберігається на користь самої
дитини, оскільки доза від одного донора недо-
статня для курсу лікування дорослої людини.
Остання обставина, разом з наявністю ознак
антигенності в цій тканині, обмежує застосу-
вання такого матеріалу для дорослого пацієнта.

Велика кількість досліджень присвячена
можливостям пересаджень СК дорослого
організму. Концентрація двох найбільш ви-
вчених різновидів СК (гемопоетичних і ме-
зенхімальних) максимальна в кістковому мозку
дорослої людини. Слід зазначити, що в дорос-
лому організмі СК виявлені в усіх активно
проліферуючих тканинах (шкіра, кістковий
мозок, печінка, кишечник та ін.) [42]. Оpub-
ліковано низку робіт, які демонструють високий
потенціал пластичності дорослих стовбурових
клітин (ДСК). Останні — із різних джерел,
одержані *in vivo* або вирошені в культурі,

можуть бути трансформовані в потрібному напрямі за допомогою різних речовин-індукторів і використані для відновлення структури та функції уражених тканин та органів [18, 43]. Проте пересадження ДСК також пов'язано з деякими проблемами.

В першу чергу, виникає питання про джерело отримання ДСК, тобто типу донора. Можливими є пересадження від гістосумісного донора (алогенні), від близнят (сингенні) або власних СК самого пацієнта (автологічні). Оскільки абсолютної імунної сумісності між різними організмами не існує, найбільш переважними є пересадження автологічних СК, введення яких цілком виключає імунний конфлікт і які найефективніше приживаються в зонах міграції. Проте головною перешкодою до клінічного застосування ДСК служить нечисленність їх популяцій.

Стовбурові кровотворні клітини (СКК) дорослого організму можуть бути одержані не тільки з кісткового мозку, але і з периферичної крові. Природно, їх вміст у цих тканинах дуже відрізняється. Якщо в кістковому мозку одна клітина припадає приблизно на 10000 клітин, то в периферичній крові — одна СК на 100000 [43]. Навіть після штучної стимуляції викиду СКК з кісткового мозку в кров введенням препаратів з чинників зростання (в основному колонієстимулювального або гранулоцитарно-макрофагального) кількість СКК у так званій «мобілізованій» *in vivo* крові збільшується недостатньо і складає лише 0,4–1% від загальної кількості ядровмісних клітин [43, 44]. При цьому було показано, що клінічна ефективність трансплантації СКК забезпечується при переливанні щонайменше $3\text{--}5 \times 10^6$ СКК на 1 кг маси пацієнта [42, 44].

Незважаючи на великий потенціал можливостей застосування СК, особливо ембріональних, їх використання у клінічній практиці зараз заборонено, оскільки Європарламент і ООН наклали мораторій на роботу з ембріональним матеріалом [18, 48]. Крім цього, широке застосування алогенних трансплантацій СК з кісткового мозку й крові обмежує необхідність ретельної перевірки донора на інфікованість вірусами герпесу, гепатитів, імунодефіциту та іншими інфекціями.

Серйозні обмеження у застосуванні СК мають місце і в Україні, що пов'язано не тільки з наведеними вище Міжнародними законодавчими актами, але й з недосконалістю методологій очищення донорського матеріалу від багатьох небезпечних вірусів.

Ці обмеження і заборони на використання ембріональних тканин, багатих на СК, можна обминути, якщо розробити нові методології, зокрема методи позаорганного збагачення клітинного матеріалу для трансплантування *in vitro*.

Найбільш оптимальною є автологічна трансплантація СКК, оскільки при цьому не треба добирати HLA-сумісних донорів, а також виключається ризик зараження різними інфекційними агентами.

Умовою успішної адаптації клітин до існування *in vitro* є наявність певного періоду, протягом якого властивості клітинної популяції відносно стабільні, що виявляється або в тривалому переживанні клітин, або в їх проліферації, а також в ініціації (за певних умов) процесів клітинного диференціювання. Крім того, однією з найважливіших умов успішного культивування є здатність клітинної популяції в усі його періоди реагувати на специфічні регулятори клітинної активності.

Для культивування, збагачення і спрямованого диференціювання, призначеного для трансплантації клітинного матеріалу будь-якого походження, існує велика кількість біотехнологій. Культуральні середовища поділяють на сироваткові і безсироваткові; вони містять в основному пластичні речовини, необхідні для життєдіяльності та проліферації СК [45]. Для підтримки культуральних середовищ використовується ряд допоміжних речовин: антибіотики, консерванти, сульфаніламід, кортикостероїди та інші [1, 30, 45, 46]. Важливе значення мають форми і властивості культуральних місткостей, їх велика різноманітність залежить від виду клітин і поставленої мети — культивування в рідкому середовищі, з прикріпленням клітин на носіях, для одно- і багатошарових культур тощо [30, 47].

У більшості варіантів роботи з культурами СК мають декілька стадій — вирощування клітин у первинній культурі, потім спрямова-

не диференціювання клітин-попередників шляхом або додавання відповідних речовин-індукторів, або шляхом подальшого пересівання клітин. Індукторами можуть бути різні речовини — ростові чинники, гормони, специфічні метаболіти, наприклад, ретиноева кислота для диференціювання СКК в клітини нервової тканини [48, 49]. Іноді використовують технології з додаванням речовин-індукторів у первинне культуральне середовище, наприклад, ростових чинників, проте цей підхід не вирішує проблему поділу клітин на різних стадіях диференціювання. Для цього розробляються методи поділу, часто з використанням складної апаратури.

У нашій роботі ми розробили концепцію «селективного культивування» стовбурових клітин. У її основу лягло припущення, що, варіюючи, компоненти культуральних живильних середовищ і фізико-хімічні параметри середовища можуть інтенсифікувати зростання заданого типу клітин.

Відомо, що темпи проліферації клітин регулюються як щільністю моношару клітинної культури, так і складом і концентрацією інгредієнтів живильного середовища, тому для стабілізації культурального зростання в режимі вибіркового колонієутворення необхідний ретельний підбір фізико-хімічних, газообмінних і біохімічних параметрів живильного середовища для отримання однорідної клітинної популяції.

При підготовці рецептур живильних середовищ із вибірковою дією слід враховувати такі чинники: відносно неспецифічні, наприклад, осмолярність, температурний режим, вміст вуглеводів, нуклеозидів, незамінних амінокислот, вітамінів, неорганічних речовин, інсуліну та ін.; специфічні, наприклад, інтерлейкіни, ростові чинники, цитокіни різного походження, зокрема з культивованих клітин.

Останні можуть бути використані як чинники, що впливають вибірково на зростання або пригнічення колонієутворювальних функцій культивованих клітин. Так, чинник, що лізирує, який вивільняється з клітин, що гинуть у разі різкої «виснажливості» окремих інгредієнтів живильних середовищ, може індукувати трансформацію зруйнованих клітинних структур в

ендогенний живильний субстрат для клітин іншого типу.

У розробленій нами технології для вирощування культури СК найдоцільніше використовувати синтетичні безсироваткові живильні субстрати. Нами розроблені, з урахуванням виду СК і фази їх зростання в культурі, сім типів оригінальних живильних середовищ. Інгредієнти, що їх складають, представлені вітамінами, амінокислотами, мікроелементами, а також сполуками білково-вуглеводно-ліпідної природи у відповідних пропорціях, які забезпечують спадковість їх використання і високу вибірковість у процесі активізації колонієутворювальної функції необхідного типу клітин при їх культивуванні. Одним із базових принципів дії цих живильних субстратів є схильність інгредієнтів, що їх складають, до вибіркової «виснажності» на певних стадіях культурального зростання клітинної маси. Це зумовлює ефект «гальмування» зростання баластних клітин і їх подальшу загибель на фоні заміщуючого зростання потрібних клітин.

Для клітин, що потребують прикріплення до субстрату, наприклад, стромальних СК кісткового мозку, переважно використовують комбіновані субстрати з синтетичними порожнистими волокнами. Порожністі волокна звичайно застосовуються в ультрафільтрації, де використовуються їх властивості до селективного проникнення макромолекул через пористу стінку волокна при постійному русі рідини через його центральний канал [50, 51]. Капілярні волокна виготовляються з різних полімерних матеріалів, причому розміри пор у стінках волокон можуть бути підібрані відповідно до поставлених завдань. Пучки синтетичних порожнистих волокон служать природним матриксом для культивованих клітин. При пропусканні із заданою швидкістю через пучок волокон культурального середовища вони проникатимуть крізь пори стінок, забезпечуючи велику поверхню для прикріплення і зростання клітин.

Вирощування стовбурових клітин *in vitro* з використанням принципів селективного культивування є одним із перспективних напрямків позаорганного збагачення клітинного матеріалу. Використання методів селективного

культивування стовбурових клітин дозволяє значно скоротити терміни вирощування необхідного клітинного матеріалу і знижує необхідність у використанні не завжди доступних і високоартісних речовин-індукторів, зокрема ростових чинників.

Література

1. *Стволовые клетки и опухолевый рост / Под ред. В.Г. Пинчука, З.А. Бутенко.* — К.: Наук. думка, 1985. — 255 с.
2. Птушкин В.В., Селидовкин Г.Д., Чимишкян К.Л. // *Гематол. и трансфузиол.* — 1996. — Т. 41, № 1. — С. 9–13.
3. Усс А.Л., Снегирь В.М., Змачинский В.А. Трансплантация гемопоэтических клеток в лечении онкогематологических заболеваний: двухлетний опыт работы Белорусского республиканского центра трансплантации костного мозга // *Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии.* — СПб, 1996. — С. 50.
4. Moskowitz C.H., Kewalramani T., Nimer S.D., Gonzalez M. // *Br. J. Haematol.* — 2004. — Vol. 124, № 5. — P. 645–652.
5. Ватулин Н.Т., Гринь В.К., Калинкина Н.В. и др. // *Укр. мед. часоп.* — 2003. — Т. 35, № 3. — С. 42–49.
6. Jackson K.A., Majka S.M., Wang H. // *J. Clin. Invest.* — 2001. — Vol. 107, № 11. — P. 1395–1402.
7. Lehmann S., Isberg B., Ljugman P., Paul C. // *Bone Marrow Transplant.* — 2000. — № 2. — P. 187–192.
8. Orlic D., Kajstra J., Chimenti S., Limana F., Jakoniuk I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2001. — Vol. 98, № 18. — P. 10344–10349.
9. Moore M.A.S. // *N. Engl. J. Med.* — 1999. — Vol. 341, № 8. — P. 605–607.
10. Викторов И.В., Сухих Г.Т. // *Вест. Рос. АМН.* — 2004. — № 4. — С. 24–30.
11. Петренко А.Ю., Грищенко В.И. // *Международ. мед. журн.* — 2003. — Т. 9, № 1. — С. 123–129.
12. Чикотеев С.П., Товаришинов А.И., Плеханов А.Н., Лепехова С.А. // *Клин. мед.* — 2003. — № 4. — С. 11–15.
13. Novuytskaja A., Smikodub A. // *Minimal. Invas. Ther.* — 1996. — Vol. 5, № 1. — P. 153–158.
14. Good R.A., Verjee T. // *Biol. Blood. Marrow. Transplant.* — Vol. 7, № 3. — С. 123–135.
15. Nagwa S., Bardi E. // *J. Transplant.* — 2000. — Vol. 70. — P. 870–877.
16. Ustin C., Idilman R., Girman G., Ozcan M. // *J. Hepatol.* — 1999. — Vol. 31. — P. 202–209.
17. Зак К.П., Бутенко А.К. // *Журн. АМН України.* — 2004. — Т. 10, № 3. — С. 593–609.
18. Вермель А.Е. // *Клин. мед.* — 2004. — Т. 82, № 1. — С. 5–11.
19. Пушкарёва С.Г. Исторические аспекты трансплантации аллогенного костного мозга // *В кн.: Проблемы трансплантации костного мозга и стволовых клеток периферической крови. Матер. Всерос. конф. с междунар. уч., 19–21 января 1999 г.* — М., 1999. — С. 7–12.
20. Бутото Н.В. Трансплантация костного мозга при лучевых поражениях. — Л.: Медицина, 1970. — 191 с.
21. Пушкарёв Н.С. // *Пробл. гематол. и перелив. крови.* — 1963. — Т. 8, № 4. — С. 47–51.
22. Баранов А.Е., Гейл Р.П., Гуськов А.К. и др. // *Гематол. и трансфузиол.* — 1989. — Т. 34, № 3. — С. 3–16.
23. Новик А.А., Богданов А.Н. Принципы трансплантации костного мозга и стволовых кроветворных клеток периферической крови. — СПб: ВМедА, 2001. — 168 с.
24. Martino M., Morabito F., Console G., Irrera G. // *Tumori.* — 2003. — Vol. 89, № 5. — P. 492–496.
25. Blay J-Y., Bouhour D., Ray-Coquard I. // *J. Clin. Oncol.* — 2000. — № 18. — P. 3643–3650.
26. Wild J., Reiche A., Andreesen R. // *Clin. Cancer Res.* — 2004. — Vol. 10, № 2. — P. 556–564.
27. Kroger N., Damon L., Sander A.R., Wandt H. // *Bone Marrow Transplant.* — 2003. — Vol. 32, № 12. — P. 1153–1157.
28. Tallman M.S., Gray R., Robert N.J. // *N. Engl. J. Med.* — 2003. — Vol. 349, № 1. — P. 17–26.
29. Demirer T., Uysal V.A., Ayli M. // *Bone Marrow Transplant.* — 2003. — Vol. 31, № 9. — P. 755–761.
30. Пушкарёв Н.С., Лобынцева Г.С., Полякова А.И. Консервация клеток лейкоконцентраата периферической крови человека при низких температурах (-196°С) с применением 10% концентрации полиэтиленоксида м.в.400 (Метод. рекомендации). — Харьков, 1979. — 6 с.
31. Gisselbrecht C., Mounier N. // *Semin Oncol.* — 2004. — Vol. 31, № 1–2. — P. 12–16.
32. Zinzani P.L., Tani M., Gabriele A. // *Haematologica.* — 2003. — Vol. 88. — P. 522–528.
33. Waddington T.M., Aboulafia D.M. // *AIDS Patient Care STDS.* — 2004. — Vol. 18, № 2. — P. 67–73.
34. Храмовская Н., Бендюг Г.Д., Иванкова В. Экспериментальное обоснование и опыт клинического применения трансплантации клеток эмбриональной печени при лечении онкологических больных // *Онкология 2000: Тез. II съезда онкологов стран СНГ (Киев, 2000).* — *Exp. Oncol. 2000.* — Vol. 22. — P. 167.
35. Гриневич Ю.А., Бендюг Г.Д., Каменец Л.Я., Мартыненко С.В., Черненко О.Д., Кузьменко А.П. // *Эксперим. онкол.* — 1991. — № 5. — С. 36–39.
36. Есартия Е.Е., Дейчман Г.И., Трапезников Н.Н. // *Вест. РОЦ.* — 1993. — № 3. — С. 53–55.
37. Петренко А.Ю., Грищенко В.И. // *Пробл. криобиол.* — 2001. — № 2. — С. 3–12.
38. Гривенков Л.А., Шкуматов А.А. // *Пробл. репродукции.* — 2002. — Т. 8, № 3. — С. 16–25.
39. Петренко А.Ю., Грищенко В.И., Очешко О.В., Петренко Ю.А. // *Международ. мед. журн.* — 2003. — Т. 9, № 3. — С. 121–126.
40. Гриневич Ю.А., Бендюг Г.Д., Храмовская Н.Н., Иванкова В.С. // *Онкол.* — 1999. — № 3. — С. 191–194.
41. Гриневич Ю.А., Смикодуб О.И., Бендюг Г.Д. та ін. Застосування трансплантації кроконсервованих гемопоетичних клітин ембріональної печінки в комплексному лікуванні хворих на злоякісні новоутворення: Метод. рекомендації. — К., 1999. — 9 с.
42. Wickenhauser C., Thiele J., Kummel T., Fischer R. // *Pathology.* — Vol. 16. — P. 1–10.
43. Korbli M., Anderlini P. // *Blood.* — 2001. — Vol. 98, № 10. — P. 2900–2908.
44. Huang S., Law P., Young D., Ho A.D. // *Exp. Hematol.* — 1998. — Vol. 26, № 12. — P. 1162–1171.
45. Qiu L., Meagher R., Welhausen S., Heye M., Brown R., Herzig R.H. // *J. Hematother. Stem. Cell. Res.* — 1999. — Vol. 8, № 6. — P. 609–618.
46. Трансплантация и искусственные органы / Под ред. В.И. Шумакова. — М.: 1986. — 267 с.
47. Пушкарёв Н.С., Лобынцева Г.С., Вотякова И.А. // *Пробл. гематол.* — 1978. — № 8. — С. 6.
48. Чертков И.Л., Дризе Н.И. // *Тер. архив.* — 2004. — № 7. — С. 5–11.
49. Строна В.И., Демин Ю.А., Шарлай Т.М. // *Пробл. криобиол.* — 2001. — № 4. — С. 61–64.
50. Практическая химия белка / Под ред. А. Дарбе. — М.: Мир, 1982. — С. 197–222.
51. Скоупс Р. Методы очистки белков. — М.: Мир, 1985. — С. 197–239.