

Гемопоетичні стовбурові клітини в трансплантації у хворих на онкогематологічну патологію

UDC 575.853:616.15:616-089.843

Ж.А. МИШАРИНА^{1*}, В.В. БАЛАН¹, І.А. КРЯЧОК², Ж.М. МИНЧЕНКО¹, Н.В. БЕЛЯЕВА¹,
YU.M. SAMSON¹, V.G. CHUYSKIY³, YE.YE. KARAMANESHT³, V.I. KHOMENKO³, V.G. BEBESHKO¹

Hemopoietic Stem Cells for Transplantation in Patients with Oncohematological Pathology

В результаті проведених досліджень встановлено, що гемопоетичні клітини, отримані з кісткового мозку (КМ), периферичної та пуповинної крові, мають високий проліферативний потенціал і можуть розглядатися як джерело трансплантації. Основним джерелом стовбурових клітин для проведення ауто- і алотрансплантації слід вважати периферичну кров (ПК). Запропоновані методи збагачення стовбурових клітин ПК дають змогу отримати достатню для проведення трансплантації кількість гемопоетичних стовбурових клітин із збереженою функціональною активністю. Використання КМ як трансплантата доцільно лише за умов недостатньої колекції стовбурових клітин ПК. Найбільш перспективним джерелом для подальшого застосування як ало- та ауто трансплантата є кордова кров.

Ключові слова: стовбурові клітини, периферична кров, кістковий мозок, кордова кров, трансплантація.

В результате проведенных исследований установлено, что гемопоэтические клетки, полученные из костного мозга (КМ), периферической и пуповинной крови, имеют высокий пролиферативный потенциал и могут рассматриваться как источник трансплантации. Основным источником стволовых клеток для проведения ауто- и аллотрансплантации следует считать периферическую кровь (ПК). Предложенные методы обогащения стволовых клеток ПК позволяют получить достаточное для проведения трансплантации количество гемопоэтических стволовых клеток с сохраненной функциональной активностью. Использование КМ как трансплантата целесообразно лишь при недостаточной коллекции стволовых клеток ПК. Наиболее перспективным источником для дальнейшего применения как алло- и ауто трансплантата является кордовая кровь.

Ключевые слова: стволовые клетки, периферическая кровь, костный мозг, кордовая кровь, трансплантация.

The research performed demonstrated that the hemopoietic cells, derived from bone marrow (BM), peripheral and cord blood, were of a high proliferative potential and might be considered as the source for transplantation. The peripheral blood (PB) should be considered as the main source of stem cells for auto- and allotransplantation performance. The proposed methods for PB stem cells enrichment enable to obtain the number of stem cells with preserved functional activity, sufficient for hemopoietic stem cells transplantation. The usage of BM as a transplant is expedient only at insufficient collection of peripheral blood SCs. Cord blood is the most perspective source for further application as allo- and autotransplantats.

Key-words: stem cells, peripheral blood, bone marrow, cord blood, transplantation.

На початку становлення клінічної трансплантації кістковий мозок (КМ) розглядався як основне джерело стовбурових клітин (СК), бо в ньому знаходиться велика кількість гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК), необхідних для проведення трансплантації [3]. Однак використання КМ як трансплантата має суттєві недоліки. У хворих на онкогематологічну патологію, а саме гострі та хронічні лейкомії, для яких характерні дифузне ураження КМ патологічними клітинами, висока вірогідність контамінації продукту СК пухлинними клітинами. Імунофенотипування клітин КМ у хворих на лейкомії і лімфоми вказує на наявність залишкового пухлинного клону при досягненні

клініко-гематологічної ремісії захворювання, що може зумовити розвиток його рецидиву [1]. Окрім того, отримання стовбурових клітин з КМ також пов'язано з певними труднощами, а саме: необхідність виконання загальної анестезії, використання спеціальних дороговартісних сетів, необхідність очищення КМ від жирової тканини, уламків кістки тощо. Останніми роками у більшості трансплантаційних центрів основним джерелом СК є периферична кров. Після проведення мобілізації СК за допомогою цитостатичних препаратів та колонієстимулюючих факторів у хворого можна отримати кількість клітин, необхідну для трансплантації. Широкого розповсюдження набувають досліджен-

¹Науковий центр радіаційної медицини АМН України, м. Київ

²Національний центр раку, м. Київ

³Київський центр трансплантації кісткового мозку ГУОЗ

* Автор, якому необхідно направляти кореспонденцію:
вул. Мельникова; 53, Київ, Україна 04050; тел.: +38 (044) 483-72-40, факс: +38 (044) 483-72-40, електронна пошта:
jmisharina@yandex.ru

¹Scientific Center for Radiation Medicine of the Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

²National Cancer Center, Kiev, Ukraine

³Kiev Center for Bone Marrow Transplantation, Kiev, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 53, Melnikova Str., Kiev, Ukraine 04050; tel.: +380 44 483 7240, fax: +380 44 483 7240, e-mail: jmisharina@yandex.ru

ня з вивчення потенціалу клітин кордової крові (КК) для подальшого застосування в трансплантації.

Мета даного дослідження – вивчення властивостей СК, отриманих з різних джерел, для обґрунтування використання їх при трансплантації у хворих на онкогематологічну патологію.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження були мононуклеари (МНК) периферичної крові (83 зразки), клітини кісткового мозку (34 зразки) хворих на онкогематологічну патологію та МНК кордової крові (44 зразки). Дослідження проведено в лабораторії імунотетики ІКР ДУ “НЦРМ АМН України”.

Пуповинну кров забирали під час пологів у здорових жінок віком від 21 до 32 років. Фракцію МНК із периферичної крові отримували методом аферезу за допомогою сепаратора “COBE Spectra”, кордової крові – в градієнті щільності Histopaque-1077 (Sigma, Німеччина). Культивування клітин, отриманих методом лейкоферезу, а також фракції МНК периферичної та пуповинної крові, здійснювали за стандартним методом. Колонієутворюючу активність *in vitro* визначали при культивуванні клітин-попередників в двошаровій агаровій системі за методом [2] в середовищі RPMI-1640 (Sigma) з 20% ембріональною сироваткою (в стандартних умовах: в атмосфері повітря з 5% CO₂ при 37°C і 100% вологості). Фідерний шар агару містив лейкоцити, отримані із гепаринізованої крові здорових дорослих донорів. Результати культивування підраховували на 14-у добу під інвертованим мікроскопом (Sedival, НДР). Препарати забарвлювали за Паппенгеймом. Вміст і фенотип клітин визначали методом проточної цитофлюориметрії на лазерному проточному цитофлюориметрі FACScan (BD, США) [4].

Результати та обговорення

Периферична кров дорослої людини містить близько 0,1% СК, що є головною перешкодою при застосуванні її як джерела гемопоетичних клітин-попередників. Підхід, який включає призначення цитостатичних препаратів в високих дозах (циклофосфамід, етопозид, цисплатин, цитозар) для досягнення глибокої мієлосупресії, цитокинів (Г-КСФ) для стимуляції виходу ГСК в кров'яне русло і сепарацію СК з крові методом апаратного цитаферезу, призводить до успішної колекції клітин, необхідної для трансплантації [3]. Встановлено, що при застосуванні режимів мобілізації, які включали цитостатичні препарати і колонієстимулюючі фактори, обробки 2–4 зразків об'єму циркулюючої крові хворих на МХ, ЛГМ та НЗЛ, кількість отриманих МНК складала 90–99,7×10⁹. Вміст

CD34⁺-клітин у продукті аферезу коливався від 0,18 до 4,9%. При перерахуванні отриманих стовбурових CD34⁺-клітин на 1 кг ваги хворого їх кількість складала 2×10⁶ у 95% хворих. У всіх хворих, колекція СК у яких була у необхідній для аутологічної трансплантації кількості та які отримали високодозову хіміотерапію, відновлення гемопоєзу зареєстровано на 10–12 добу, що є свідченням приживлення трансплантата. Суттєвою проблемою при використанні як трансплантата ГСК периферичної крові є можлива контамінація продукту пухлинними клітинами при гострих і хронічних лейкеміях та злоякісних неходжкінських лімфомах.

Гемопоетичні стовбурові клітини кордової крові посідають чільне місце за ступенем проліферативного та репопуляційного потенціалу. Використання КК як трансплантата має ряд переваг: відсутні ризики для матері та дитини; немає необхідності проведення анестезії, скорочується час на пошуки донора при наявності банку; можливість якісного довгострокового зберігання для проведення аутологічної трансплантації. Однак залишаються нерозв'язаними такі питання, як визначення оптимальної кількості ГСК кордової крові для трансплантації, допустима максимальна вага реципієнта, збереження функціональних властивостей ГСК після збагачення *in vitro*, особливості перебігу реакції “трансплантат проти хазяїна” тощо. В Україні дотепер не прийняті стандарти якості і нормативні документи для застосування КК як трансплантата.

За результатами проведених досліджень встановлено, що КК містить більше ГСК у порівнянні з вмістом їх у КМ і периферичній крові. Культуральні дослідження підтвердили високу функціональну активність клітин-попередників, отриманих з КК. Найбільша кількість колоній стовбурових клітин КК реєструвалась на 14 добу культивування і становила 145,5±8,44. Вміст CD34⁺-клітин в зразках КК коливався в межах 0,56–1,9% від об'єму фракції.

Незважаючи на те, що в одиниці об'єму КК міститься значна кількість СК, найбільш суттєвою проблемою в трансплантології залишається обмежена кількість КК, яку можна зібрати з пуповинного канатика під час пологів. Ми проводили розробки збагачення кількості СК у зразках КК.

Найбільш ефективним способом збагачення КК виявилось використання супернатанта культури мононуклеарів КК. Встановлено, що додавання супернатанта денної культури мононуклеарів КК, стимульованої ФГА, збільшувало ефект колонієутворення (ЕКУ) мононуклеарів КК приблизно у 1,5 рази. При збагаченні культури надосадовою рідиною, отриманою після 14-денного культивування клітин-попередників тієї ж КК, ЕКУ підви-

щувалась в 1,9 рази, а найбільша кількість колоній стовбурових клітин КК реєструвалась на 14 добу культивування.

Після стимуляції та культивування клітин КК відзначено накопичення клітин з фенотипом CD34⁺/CD38⁻HLADR⁻CD45⁻CD33⁻CD36⁺CD71⁺⁺; CD34⁺CD38⁻HLADR⁻HLADR^{low}CD45⁻CD33⁺CD36⁺CD71⁺, що відповідає раннім еритроїдним попередникам. CD34⁺-субпопуляція відзначалась більш дозрілим антигенним складом, що асоціювалось, перш за все, з підвищенням рівня щільності CD38-антигена і зниженням CD34, а також з появою на поверхневих мембранах клітин таких лінійно-специфічних антигенів, як CD33, CD13, CD14, HLA-DR, і збільшенням щільності ранніх еритроїдних маркерів CD36, CD71. Відсоткова кількість найбільш ранніх поліпотентних клітин після індукції не змінювалась при значному підвищенні інтенсивності флюоресценції CD117 антигену на негативній фракції. Це є свідченням позитивного індукуючого ефекту запропонованого підходу.

Висновки

Таким чином, розробки з питань вивчення КК як потенційного джерела для проведення аутологічної і алогенної трансплантації є найбільш перспективними. Вважаємо, що в Україні необхідно створити банк пуповинної крові для подальшого її застосування при проведенні трансплантації ГСК для лікування онкологічних, онкогематологічних

захворювань. Варто зазначити, що при застосуванні КК у трансплантації необхідною умовою є попередня стандартизація продукту КК за такими кількісними та якісними показниками: визначення групової та резус-належності; типізування за антигенами гістосумісності 1 і 2 класу; кількісне визначення ядровмісних клітин у одиниці об'єму КК; кількісне визначення CD34-позитивних клітин у одиниці об'єму КК; визначення функціональної активності стовбурових клітин КК за показниками ЕКУ; цитогенетичні дослідження для визначення можливої трансмісії генетичних порушень. Крім того, обов'язковою умовою при трансплантації з використанням КК є визначення інфекційних збудників у субстраті.

Література

1. Волкова М.А. Клиническая онкогематология.– М.: Медицина, 2001.– 576 с.
2. Гольберг Е.Д. Методы культуры ткани в гематологии.– Томск: Изд-во ТГУ, 1992.– 272 с.
3. Hematopoietic stem cell transplantation / Ed. by A. Ho, R. Hass, R. Champlin.– New York: Marcel Dekker, 2000.– 604 p.
4. Kato K., Radbruch A. Isolation and characterization of CD 34⁺ hematopoietic stem cells from human peripheral blood by high-gradient magnetic cell sorting // Cytometry.– 1993.– Vol. 14, N4.– P. 384–392.

Надійшла 10.07.2008