

## ТРАНСПЛАНТАЦИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК — ПЕРСПЕКТИВНОЕ НАПРАВЛЕНИЕ ТЕРАПИИ XXI ВЕКА. 2. СТВОЛОВЫЕ КРОВЕТВОРНЫЕ КЛЕТКИ ИЗ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ

Профессор А.Ю. ПЕТРЕНКО, академик НАН Украины В.И. ГРИЩЕНКО

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков*

**Представлены аналитический обзор литературы и результаты собственных исследований авторов, которые посвящены стволовым кроветворным клеткам, полученным из различных онтогенетических источников. Показаны перспективы их применения в клинике для лечения патологии систем кроветворения.**

Трансплантация стволовых клеток может произвести революцию в медицине XXI в., если человечество научится управлять и правильно использовать уникальные свойства этих клеток, описанные нами в предыдущей работе [1]. Среди региональных мультипотентных стволовых клеток наибольшее внимание привлекают стволовые гемопоэтические, или кроветворные, клетки (СКК). Это связано с относительной простотой их получения, многолетним опытом исследования и высоким терапевтическим потенциалом. В настоящее время в ряде стран проводятся широкомасштабные клинические испытания СКК, в ходе которых показана их высокая эффективность при лечении наследственной и приобретенной гематологической, онкологической и иммунной патологии.

Термин «стволовая клетка» был введен в 1910 г. профессором Военно-медицинской академии (Санкт-Петербург) А.А.Максимовым для определения кроветворной клетки из костного мозга, которую он считал предшественницей всех клеточных элементов крови. Это подтверждает современная схема гемопоэза (рис. 1). Функция СКК — маленькой клетки округлой формы с большим ядром, окруженным узким ободком цитоплазмы, — ежедневное образование  $10^{11}$  новых клеток всех видов.

Исследования СКК начались в 60-е годы, когда удалось в первом приближении определить общие фенотипические свойства клеток костного мозга, способных самообновляться и образовывать другие клеточные элементы. Более чем 40-летний опыт изучения СКК костного мозга позволил обосновать их применение для лечения различной патологии системы кроветворения. Ни один другой тип стволовых клеток в настоящее время не имеет подобных масштабов использования в медицине для этих целей и такого опыта исследования. Открытие других источников СКК, пригодных для трансплантации, таких как кордовая (пуповинная) кровь и эмбриональная печень, разделило исследователей, работающих в этой области, на два лагеря: одни признают только количественные различия доли СКК в общем пуле ядросодержащих клеток, другие полагают, что свойства СКК, полученных из различных источников, отличаются.

Целью настоящей работы явилось обобщение данных о свойствах СКК, полученных из разных источников.

### ИДЕНТИФИКАЦИЯ СКК

**Фенотипические свойства СКК.** Общепринятым методом идентификации клеток является определение на их поверхности специфических маркеров. Наиболее известным маркером СКК является CD34 — антиген, который представляет собой мембранный гликопротеид молекулярной массой около 110 кДа, несущий несколько сайтов гликозилирования. Ген, кодирующий CD34, локализован на 1-й хромосоме. Функция антигена CD34 связана с взаимодействием ранних предшественников гемопоэза со стромой с участием L-селектина. Наличие антигена CD34 на поверхности клетки позволяет весьма грубо и относительно оценить долю СКК в суспензии, поскольку он экспрессируется и другими предшественниками гемопоэза, а также стромальными клетками костного мозга [2] и эндотелиальными клетками [3].

По мере коммитированности уровень экспрессии CD34 снижается с одновременным увеличением экспрессии другого антигена — CD38 — инте-

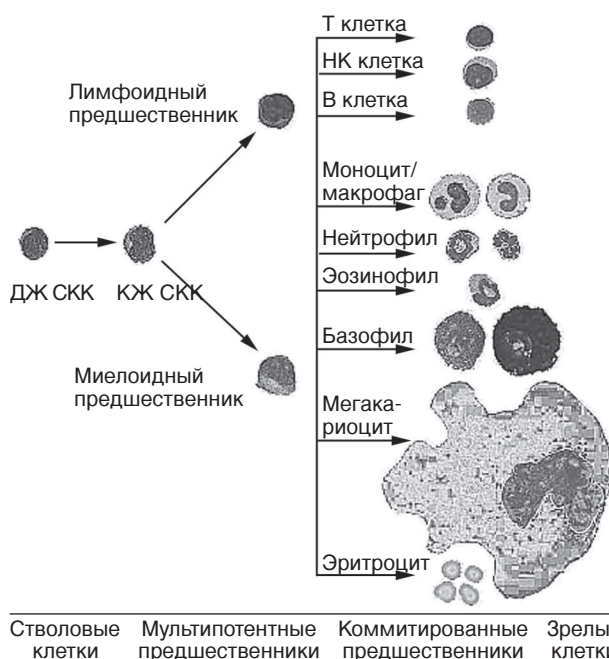


Рис. 1. Схема кроветворения по J. Domen, I.L. Weissman [13]: ДЖ — долгоживущая; КЖ — короткоживущая СКК

грального мембранного гликопротеида массой 46 кДа, обладающего NAD-гликогидролазной и ADP-рибозилциклазной активностью, что предполагает его роль в транспорте и синтезе ADP-рибозы [4]. Таким образом, популяция клеток с фенотипом CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>, составляющая более 90% CD34-позитивных клеток в костном мозге, содержит предшественники с ограниченным дифференцировочным потенциалом, а на роль СКК претендуют CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> клетки.

В качестве альтернативы CD34 для идентификации СКК рассматриваются два маркера: AC133 и Thy1, которые избирательно экспрессируются на CD34<sup>+</sup> клетках. Антиген Thy-1 (CD90), который ко-экспрессируется с рецептором c-kit (CD117), представляет собой поверхностный фосфатидилинозитолсвязывающий гликопротеин молекулярной массой 25–35 кДа, участвующий в адгезии клеток [5]. Показано [6], что среди популяции CD34<sup>+</sup>Thy1<sup>+</sup> присутствуют клетки, способные к самообновлению и образованию длительно культивируемых линий, однако, учитывая, что содержание Thy1<sup>+</sup> в популяции CD34<sup>+</sup> клеток составляет около 50%, что значительно превышает содержание СКК, следует признать, что наличие этого маркера является недостаточным для идентификации СКК.

AC133 — новый маркер предшественников гемопоэтических клеток [7], обнаруженный в клетках эмбриональной печени. Он представляет собой трансмембранный гликопротеид, экспрессирующийся на поверхности мембраны при самом раннем созревании СКК, возможно, раньше, чем CD34 антиген [8]. В наших исследованиях на клетках эмбриональной печени его экспрессия на CD34-позитивных клетках составляет около 30%. Суммируя мнение различных авторов, в качестве претендентов на СКК в настоящее время можно рассматривать клетки, на поверхности которых присутствуют CD34, AC133 и Thy1 антигены и отсутствуют CD38, HLA-DR и другие маркеры дифференциации (так называемые CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> клетки). К маркерам дифференциации (lineage, Lin) относят гликофорин А (GPA), CD3, CD4, CD8, CD10, CD14, CD16, CD19, CD20 [9].

Сотрудники лаборатории Terry Fox (Канада), наиболее долго и последовательно исследующие возрастные различия СКК, для выявления последних используют фенотип CD34<sup>+</sup>CD45Ra<sup>low</sup> CD71<sup>low</sup> [10–12]. Клетки, описываемые данной формулой, оказались функционально неотличимыми от CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> клеток [11]. Сотрудники лаборатории Вейсмана [13; 14] используют для описания СКК человека следующую формулу: CD34<sup>+</sup> Thy1<sup>+</sup> CD38<sup>low/-</sup> c-kit<sup>-/low</sup>. Об ее объективности можно судить по экспериментам, в которых 30 клеток, выделенных по данной схеме, полностью восстанавливали кроветворение мышей на период не менее 7 нед.

Применение маркеров дифференциации СКК имеет большое значение для изучения механизмов, регулирующих их функционирование и судьбу, так как они позволяют избирательно пометить клетки моноклональными антителами, ковалентно связанными с флуоресцентной или магнитной меткой, и выделить их с помощью соответствующего клеточного сортера.

*Функциональные методы идентификации СКК.*

Наиболее широко используемым критерием идентификации СКК является их способность образовывать колонии взрослых клеток крови в культуре. Исследования образующихся колоний, проведенные в 70–80-е годы, позволили идентифицировать и количественно оценить несколько типов клеток-предшественников различной степени коммитированности. Определение колониеобразующей активности позволяет оценить степень коммитированности кроветворных клеток и направление их дифференциации. Клоногенная активность определяется в полутвердых средах (метилцеллюлоза, агар, плазменный гель или фибриновый сгусток), которые, с одной стороны, уменьшают подвижность клеток, а с другой — предотвращают их прикрепление к поверхности стекла или пластика. Эти два условия необходимы для того, чтобы из одиночной клетки за 7–18 дней культивирования развились клоны, которые идентифицируются как одиночные кластеры (до 50 клеток) или колонии (более 50 клеток). Количество клеток, способных образовать колонию, так называемых колониеобразующих единиц (КОЕ) или колониеобразующих клеток (КОК), не равно, но коррелирует с количеством СКК в клеточной суспензии.

Несомненным преимуществом клоногенных исследований является то, что они позволяют по размеру и составу колоний определить степень зрелости и направление дифференциации клетки-предшественника. По мере коммитированности общее количество клеток и число типов клеток в колонии снижается. Например, СКК или наиболее ранняя клетка — предшественник миелоидного ростка, не способная к самообновлению, КОЕ-ГЭММ (CFU-GEMM) образует большую мультилинейную колонию, содержащую гранулоциты, эритроциты, моноциты и мегакариоциты. Более коммитированная клетка КОЕ-ГМ (CFU-GM) дает рост колонии, содержащей гранулоциты и макрофаги, а КОЕ-Г (CFU-G) в культуре дает мелкую колонию зрелых гранулоцитов. Предшественники эритроцитов образуют два типа колоний: ранний предшественник образует крупные БОЕ-Э (BFU-E, бурстобразующую единицу эритроцитов), а более поздний — мелкие КОЕ-Э (CFU-E). Таким образом, в полутвердой культуре можно идентифицировать шесть типов миелоидных колоний: КОЕ-ГЭММ, КОЕ-ГМ, КОЕ-Г, КОЕ-М, КОЕ-Э и БОЕ-Э.

Учитывая, что СКК характеризуются наиболее высоким пролиферативным потенциалом и образуют большие по размеру колонии, по числу таких колоний можно косвенно оценить количество стволовых клеток. Так, авторы работ [15; 16] показали, что клетки, образующие колонии более 0,5 мм в диаметре и содержащие более 1000 клеток (их назвали колониеобразующие клетки с высоким пролиферативным потенциалом, КОЕ-ВПП (HPP-CFC)), по устойчивости к окололетальным дозам 5-фторурацила и по способности репопуляции очень близки к СКК.

Другой метод — долгосрочное культивирование — позволяет оценить количество клеток, «иницирующих» долгосрочную культуру (long-term culture-initiating cell, LTC-IC). Метод основан на наблюдении, что стромальные клетки костного мозга

и/или определенный коктейль ростовых факторов способны в течение долгосрочного — не менее 5 нед — культивирования (long-term culture, LTC) поддерживать жизнеспособность и колониеобразующую активность клеток-предшественников. Учитывая, что время жизни коммитированных КОЕ в культуре ограничивается тремя неделями, клетки, способные образовывать колонии после 5 нед культивирования, могут быть использованы для определения количества LTC-ИС. Количество LTC-ИС, определенное таким образом, можно считать функциональным аналогом СКК, поскольку они характеризуются высоким репродукционным потенциалом, значительная их часть (около 20%) имеет фенотип CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> и способна к самообновлению [17]. Частота встречаемости LTC-ИС в костном мозге человека составляет 1:50 000.

Однако наиболее близким аналогом СКК, очевидно, следует считать миелоид-лимфоидиницирующую клетку, полученную через 15 нед культивирования в условиях, близких к условиям культивирования LTC. Эти клетки встречаются в 10 раз реже LTC-ИС и способны давать рост как в миелоидном, так и в лимфоидном ростках кроветворения [18; 19].

J. Domen, I.L. Weissman [13] предлагают репродукционный подход к идентификации СКК (рис.1), различая долговременную СКК (long-term hematopoietic stem cell, LT-HSC), способную восстанавливать кроветворную систему на протяжении всей жизни, и кратковременную СКК (short-term hematopoietic stem cell, ST-HSC), выполняющую эту функцию в течение ограниченного времени. В любом случае, несмотря на широкие вариации использованных маркеров и методов идентификации, следует признать, что СКК является исключительно редкой клеткой.

### ИСТОЧНИКИ СКК

Кроветворение зарождается в кровяных островках желточного мешка. Гемопоэтические клетки желточного мешка имеют очень ограниченный дифференцировочный потенциал *in vitro* и не способны к долговременному восстановлению гемопоэза при трансплантации [20]. Следует полагать, что эти клетки не являются предшественниками СКК взрослого организма, которые появляются несколько позднее, на 3–5-й нед, сначала в месте, где начинается формирование тканей желудка и эндотелия кровеносных сосудов (para-aortic splanchnopleura, P-SP), а затем аорты, гонад и плодовых почек — мезонефроза (AGM район) [21]. Клетки AGM района помимо гемопоэтических могут также образовывать и эндотелиальные клетки кровеносных сосудов, и остеокласты, вовлекаемые в формирование костной ткани [22]. Начиная с 6-й нед кроветворение перемещается в печень, которая остается основным кроветворным органом плода до самого рождения.

Количество СКК, достаточное для трансплантации, может быть получено из четырех источников: костного мозга, периферической крови, кордовой крови и эмбриональной печени. Усилия современной науки направлены на разработку пятого источника СКК — плюрипотентных эмбриональных стволовых клеток. В настоящее время, пока ведутся эксперимен-

тальные работы по размножению и направленной дифференцировке этих клеток *ex vivo*, этот источник представляет лишь теоретический интерес.

**Костный мозг.** Уже на протяжении 40 лет основным источником СКК является суспензия клеток костного мозга, которая извлекается обычно из тазовой или грудной кости под местной анестезией. Полученная суспензия представляет собой смесь СКК, клеток стромы, коммитированных предшественников и зрелых эритроцитов и лейкоцитов. Содержание претендентов на роль стволовых клеток в костном мозге приведено в таблице.

**Периферическая кровь.** Содержание СКК в кровеносном русле настолько мало (на 100 000 кле-

*Процентное содержание CD34<sup>+</sup> и CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> клеток в популяции мононуклеаров из различных источников кроветворения [23; 24]*

Источник	CD34 <sup>+</sup>	CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup>
Периферическая кровь*	0,4–1,6	0,0–0,4
Костный мозг	0,5–3,6	0,0–0,5
Кордовая кровь	0,1–2,6	0,0–0,6
Эмбриональная печень	2,3–25,8	0,2–12,5

\* Кровь мобилизована под воздействием гранулоцитколониестимулирующего фактора (G-CSF).

ток крови приходится 1 СКК), что их выделение не оправдывает себя. Однако оказалось, что путем предварительной обработки донора циклофосфамидом и/или ростовыми факторами, такими как гранулоцитколониестимулирующий фактор (G-CSF), можно стимулировать выход СКК из костного мозга. Мобилизованная таким образом периферическая кровь содержит, как видно из таблицы, 0,4±1,6% CD34<sup>+</sup> клеток. Однако в этом случае периферическая кровь является не первоисточником, а временным местом циркуляции СКК костного мозга, т.е. средой, используемой в методе их извлечения.

**Кордовая кровь.** В конце 1980-х — начале 1990-х годов было установлено, что кровь пуповинного канатика, обеспечивающая жизнедеятельность плода в течение беременности, характеризуется высоким содержанием СКК. Простота получения клеток кордовой крови и отсутствие этических ограничений (пуповина извлекается из тела матери вместе с ребенком и остается невостребованной) привлекли к этим клеткам внимание трансплантологов. После первой успешной трансплантации кордовой крови ребенку с анемией Фанкони терапевтическое использование этих клеток очень быстро развивается, и сейчас банки кордовой крови организованы во всем мире. Самый большой из них — Нью-Йоркский центр плацентарной крови — финансируется Национальным институтом здоровья (США) и насчитывает 13 000 образцов, пригодных для трансплантации. Пациенты, как правило, дети, которым была произведена трансплантация, живут уже более 10 лет без осложнений основного заболевания [25].

Трансплантация клеток кордовой крови реже, чем клеток костного мозга, вызывает осложнения, связан-

ные с реакцией трансплантат против хозяина (РТПХ) [26]. Это связано со слабой экспрессией на клетках кордовой крови HLA-DR антигенов и их незрелостью [27]. Основной популяцией ядерных клеток кордовой крови являются Т-лимфоциты (CD3-позитивные клетки), содержание которых составляет около 50%, что на 20% меньше, чем в периферической крови взрослого человека, хотя фенотипический анализ субпопуляций Т-клеток из этих источников отличается незначительно.

Обычно из кордовой крови выделяют около  $10^6$  СКК. До настоящего времени остается открытым вопрос: достаточным ли является количество клеток кордовой крови, полученных от одного донора, для восстановления кроветворения взрослого реципиента? Некоторые исследователи [28; 29] полагают, что такого количества достаточно для трансплантации детям, но слишком мало для взрослого человека, для которого оптимальным является введение  $7-10 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> клеток на 1 кг массы тела. При этом количественная оценка основывается на аналогии с костным мозгом и не учитывает возрастных особенностей гемопоэтической системы, в частности, более высокого пролиферативного потенциала СКК из кордовой крови по сравнению с костным мозгом [30]. Исследования *in vitro* позволяют полагать, что одной дозы кордовой крови достаточно для реконструкции гемопоэза взрослого реципиента [10; 31].

*Эмбриональная печень.* Начиная с 6-й нед развития плода человека и до рождения печень, как уже отмечалось, является основным кроветворным органом. До 18-й нед, когда начинается гемопоэз в костном мозге, в выполнение гемопоэтической функции вовлечено более 60% клеток печени. До 13-й нед развития у плода человека отсутствуют тимус и соответственно Т-лимфоциты [32]. Поэтому трансплантация клеток эмбриональной печени 6–12 нед гестации исключает развитие РТПХ и не требует подбора гистосовместимого донора. Этот постулат подтвержден в исследованиях на разных видах животных: мышах, крысах, свиньях, овцах, лошадях и приматах [33].

Эмбриональная печень содержит полную иерархию наиболее примитивных предшественников гемопоэза, которые можно определить функциональными тестами. Это эритроидные, гранулопоэтические, мегакариопоэтические и мультилинейные колониеобразующие клетки, а также их более примитивные предшественники — LTC-IC, способные пролиферировать и дифференцироваться в течение более 5 нед *in vitro* и приживляться в организме реципиента при аллогенной и ксеногенной трансплантации иммунодефицитным животным [11; 34]. В связи с тем, что эмбриональная печень в первую очередь должна обеспечить эритроцитами быстро растущий объем крови развивающегося плода, в ней преобладают эритроидные клетки, процентное содержание которых достигает 90% общего количества гемопоэтических клеток [35]. В основной массе это ядерные эритроидные предшественники различной степени зрелости, содержащие фетальный гемоглобин ( $\alpha_2\gamma_2$ ), который благодаря более высокому по сравнению со «взрослым» средству к кислороду обеспечивает абсорбцию

последнего из материнской крови. Высокий уровень эритропоэза обеспечивается тем, что эмбриональная печень является местом образования эритропоэтина (ЕРО). Его присутствия достаточно для стимуляции эритропоэза в суспензии моноядерных клеток эмбриональной печени, в то время как при использовании костного мозга и кордовой крови для этой цели необходим набор ростовых факторов, помимо ЕРО включающий SCF, GM-CSF и IL-3 [9]. Вместе с тем СКК эмбриональной печени не реагируют на ЕРО, и это позволяет полагать, что чувствительность к нему возникает при образовании CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> клеток, в которых начинает экспрессироваться рецептор к эритропоэтину [36].

Эмбриональная печень по сравнению с другими источниками характеризуется самым высоким содержанием СКК (см. таблицу). При этом примерно 30% CD34<sup>+</sup> ее клеток являются CD38<sup>-</sup>. Количество лимфоидных предшественников (CD45<sup>+</sup>) на ранних сроках кроветворения в печени составляет около 4% [35]. По мере развития плода от 7 до 17 нед количество В-лимфоцитов линейно увеличивается в среднем на 1,1% в месяц, а количество СКК снижается [32].

Анализ результатов, полученных при изучении известных гемопоэтических источников, показывает, что по клеточному составу на всех стадиях онтогенеза ядерные клетки представлены в основном окончательно дифференцированными клетками. Их доля и состав зависят от онтогенетического возраста источника. Так, общая популяция ядерных клеток костного мозга и кордовой крови на 50% и более состоит из лимфоидных клеток, в то время как в эмбриональной печени их доля составляет менее 10%. Среди миелоидных клеток в эмбриональной и фетальной печени преобладают эритроидные, а в кордовой крови и костном мозге — гранулоцитарно-макрофагальные.

Эмбриональная печень отличается от остальных рассматриваемых источников гемопоэза высоким содержанием не окончательно дифференцированных клеток. Это относится как к «сильно» коммитированным клеткам, так и к ранним, способным образовывать колонии при культивировании. При культивировании в присутствии ростовых факторов клетки фетальной печени фенотипа CD34<sup>+</sup>CD45Ra<sup>low</sup>CD71<sup>low</sup> образовывали колонии в 30 раз больше, чем аналогичные клетки кордовой крови, и в 90 раз больше, чем костный мозг [11]. Особенно велики различия в количестве наиболее ранних предшественников, способных к образованию смешанных колоний CFU-GEMM. Их содержание в фетальной печени было приблизительно в 60 и 250 раз выше, чем в кордовой крови и костном мозге соответственно.

Ряд авторов отмечает, что клетки фетальной печени образуют колонии, по размеру значительно превышающие таковые из кордовой крови и костного мозга [11; 34], причем это относится ко всем типам колоний. Этот факт свидетельствует о более высоком пролиферативном потенциале клеток фетальной печени. Очевидно, уникальным свойством фетальной печени является более короткий по сравнению с другими источниками клеточный цикл СКК [11], что

может иметь большое значение для эффективности репопуляции при трансплантации.

Существенные различия между СКК из различных гемопоэтических источников были обнаружены по способности к самообновлению в культуре с цитокинами и сигнальными молекулами. Например, Van Zant et al. [37], используя постоянно перфузируемую культуру, помещенную в биореактор, достигли 20-кратного увеличения количества СКК кордовой крови человека в течение 2 нед, а культивирование СКК эмбриональной печени раннего срока гестации позволило в течение первых 2–3 дней добиться 15-кратного увеличения [38].

Известно, что у эукариотов хромосомы заканчиваются нуклеопротеиновыми последовательностями, названными теломерами, которые представляют собой повторы нуклеотидов (TTAGGG)<sub>n</sub>. Теломеры играют важную роль в сохранении стабильности и деятельности клетки, а их потеря служит сигналом о прекращении деления и последующей гибели клетки. Теломеразные последовательности синтезируются теломеразой, при отсутствии которой число теломеров уменьшается с каждым делением, т.е. они являются своеобразными митотическими часами, остановка которых ведет к гибели. Потеря теломеров *in vitro* показана на фибробластах и лимфоцитах человека, *in vivo* — на клетках кожи, лейкоцитах периферической крови, клетках эпителия желудка. Вместе с тем снижения числа теломеров не выявлено в спермиях человека, а также в «бессмертных» раковых клетках, которые характеризуются высоким уровнем теломеразной активности.

Если постулировать, что теломеразная активность отражает способность клетки к самообновлению, то установление ее активности позволило бы ответить на вопрос, отличаются ли СКК, полученные из различных онтогенетических источников. Для выяснения этого вопроса авторы работы [12] исследовали длину теломеров в претендентах на роль стволовых клеток фенотипа CD34<sup>+</sup>, CD45Ra<sup>low</sup>, CD71<sup>low</sup>, выделенных из эмбриональной печени, кордовой крови и костного мозга. Авторы показали, что начальная длина теломера у клеток ранних сроков развития (эмбриональной печени и кордовой крови) была значительно ( $p < 0,001$ ) выше, чем взрослого костного мозга. Другим выявленным отличием явился тот факт, что при индукции пролиферации СКК эмбриональной печени теряли теломеры с меньшей скоростью по сравнению с кордовой кровью и костным мозгом. Эти результаты свидетельствуют о том, что способность к самообновлению у СКК эмбриональной печени выше, чем у кордовой крови и костного мозга.

Приведенные данные убедительно свидетельствуют о том, что СКК, полученные из источников, различающихся по уровню онтогенетического развития, отличаются по своим фенотипическим и функциональным свойствам. СКК, полученные на ранних стадиях развития, обладают большей способностью к самообновлению, пролиферативной активностью, мультилинейностью при дифференциации, длиной теломера, а также медленнее отторгаются иммунной системой реципиента, т.е. потенциально являются

более предпочтительными для трансплантации. Количество стволовых клеток (КОЕ и LTC-IC) и их потенциал к самообновлению и образованию нескольких типов дифференцированных потомков снижаются в ряду: ЭП→КК→КМ. При этом следует иметь в виду, что и внутри каждого из этих источников существуют возрастные различия. Так, СКК костного мозга, взятые из молодого организма, характеризуются большим пролиферативным потенциалом и репопулирующей способностью, чем полученные из организма взрослого.

Следует отметить, что количество СКК уменьшается в процессе развития. Так, содержание CD34<sup>+</sup> клеток в кордовой крови линейно снижается в 5 раз в сроки от 20 нед гестации (при преждевременном прерывании беременности) до 40 нед (нормальные роды) [39] при одновременном увеличении экспрессии маркеров дифференциации [40].

Для выяснения вопроса, существуют ли подобные различия в СКК эмбриональной печени, исследовали колониобразующую активность клеток печени эмбрионов человека 6–8 и 9–12 нед гестации. Культивирование проводили в течение 14 дней в полужидкой среде в присутствии ростовых факторов SCF, GM-CSF, IL-3, IL-6 и эритропоэтина.

Из рис.2 видно, что общее число колоний более чем в 1,5 раза больше в образцах более ранних сроков, причем эти различия обусловлены, главным образом, разницей в числе самых ранних колоний (КОЕ-ГЭММ), количество которых на 6–8 нед более чем в 3 раза превышает их число в 9–12 нед. Следует отметить, что колониобразующая активность клеток, полученных из печени эмбрионов первого триместра гестации, приведенная на рис. 2, значительно выше, чем клеток эмбрионов второго триместра, определенная аналогичным методом в работе [41]. Следовательно, клетки эмбриональной печени ранних сроков характеризуются не только более высоким содержанием КОЕ, но и большей способностью дифференцироваться в различные типы клеток кроветворной системы.

Эти результаты имеют большое клиническое значение, поскольку показывают, что одинакового или даже большего терапевтического эффекта можно

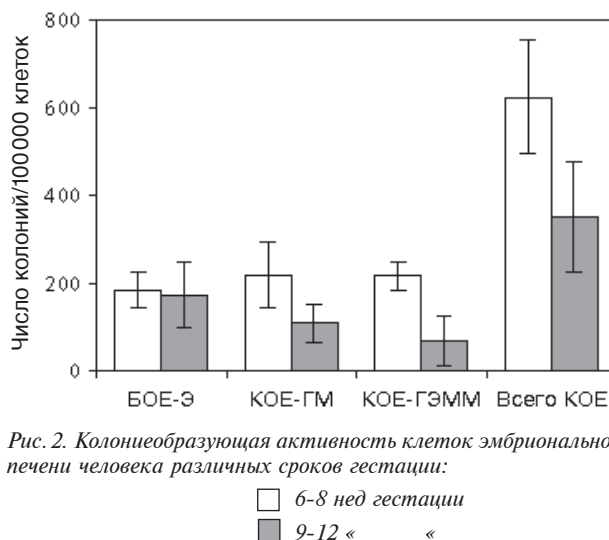


Рис. 2. Колониобразующая активность клеток эмбриональной печени человека различных сроков гестации:

□ 6-8 нед гестации  
 ■ 9-12 « «

достичь путем трансплантации меньшего количества клеток, полученных из печени эмбрионов более ранних сроков гестации.

Существующие на сегодняшний день разноречивые данные об идентификации и свойствах СКК не позволяют доказать, но дают основание полагать, что эмбриональная печень человека 6–12 нед гестации, когда еще не началось кроветворение в селезенке, тимусе и костном мозге, является наиболее полным источником стволовых кроветворных клеток, обеспечивающим выполнение гемопоэтической функции в ходе всего последующего онтогенетического (пренатального и постнатального) развития.

#### Литература

1. Петренко А.Ю., Грищенко В.И. Трансплантация стволовых клеток — терапия XXI века. I. Характеристика и свойства стволовых клеток // Пробл. криобиол.— 2001.— № 2.— С3–12.
2. Simmons P.J., Torok-Storb B. CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow // Blood.— 1991.— V.78.— P.2848.
3. Human embryonic germ cells derivation express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro / M.J. Shamblott, J. Axelman, J.W.Littlefield et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 2001.— V.98.— P.113–118.
4. Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured in limiting dilution on supportive marrow-stromal layers / H.J. Sutherland, P.M. Landsdorp, D.H. Henkelman et al. // Ibid.— 1990.— V.87.— P.3584–3588.
5. Thy-1 (CDw90) and c-kit receptor (CD117) expression on CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells: a five-dimensional flow cytometric study / G.D'Arena, P.Musto, N.Cascavilla et al. // Hematologica.— 1998.— V.83.— P.587.
6. The CD34<sup>+</sup> Thy<sup>+</sup> cell population: are they all stem cells? / D.Bouscary, C.Lacombe, F.Dreyfus, M.Fontenay-Roupie // Exp.Hematol.— 2000.— V.28.— P.1312–1314.
7. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning / S.Miraglia, W.Godfrey, A.H.Yin et al. // Blood.— 1997.— V.90.— P.5013–5021.
8. Getting closer to the hematopoietic stem cells utilizing internal CD34 expression / D.Pearce, R.Pettengell, E.C.Gordon-Smith, C.P.McGuckin // Exp.Hematol.— 2000.— V.28.— P.81.
9. Muench M.O., Nantikawa R. Disparate regulation of human fetal erythropoiesis by the microenvironments of the liver and bone marrow // Blood Cells, Molecules, and Diseases.— 2001.— V.27, № 2.— P.377–390.
10. Lansdorp P.M., Dragowska W., Mayani H. Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells // J.Exp.Med.— 1993.— V.178.— P.787–791.
11. Unique differentiation programs of human fetal liver stem cells shown both in vitro and in vivo in NOD/SCID mice / F.E.Nicolini, T.L.Holyoake, J.D.Cashman et al. // Blood.— 1999.— V.94.— P.2686–2695.
12. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age / H.Vaziri, E.Dragowska, R.C.Allsopp et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 1994.— V.91.— P.9857–9860.
13. Domen J., Weissman I.L. Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate // Mol.Med.Today.— 1999.— V.5.— P.201–208.
14. Smith L.G., Weissman I.L., Helffeld S. Clonal analysis of hematopoietic stem-cell differentiation in vivo // Proc.Natl.Acad.Sci.USA.— 1991.— V.88.— P.2788–2792.
15. The resolution, enrichment, and organization of normal bone marrow high proliferative potential colony-forming cell subsets on the basis of rhodamine-123 fluorescence / I.Bertoncello, T.R.Bradley, G.S.Hodgson, J.M.Dunlop // Exp.Hematol.— 1991.— V.19.— P.174–178.
16. Mixed colony formation in vitro by the heterogeneous compartment of multipotential progenitors in human bone marrow / T.L.Holyoake, M.G.Freshney, G.Konwalinka et al. // Leukemia.— 1993.— V.7.— P.207–213.
17. Self-renewal of primitive human hematopoietic cells (long-term culture-initiating cells) in vitro and their expression in defined medium / A.L.Petzer, D.E.Hogge, P.M.Landsdorp et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 1996.— V.93.— P.1470–1474.
18. Lemieux M.E., Evans C.J. Identification of properties that can distinguish primitive populations of stromal-cell-responsive lympho-myeloid cells from cells that are stromal-cell-responsive but lymphoid-restricted and cells that have lympho-myeloid potential but are also capable of competitively repopulating myeloablated recipients // Blood.— 1996.— V.88.— P.1639–1648.
19. The myeloid-lymphoid initiating cell (ML-IC) assay assesses the fate of multipotent human progenitors in vitro / M.Punzel, S.D.Wissink, J.S.Miller et al. // Ibid.— 1999.— V.93.— P.3750–3756.
20. Developmental changes in the differentiation capacity of hematopoietic stem cells / C.Bonifer, N.Faust, H.Geiger, A.M.Muller // Immunology Today.— 1998.— V.19, № 5.— P.236–241.
21. Dzierzak E. Embryonic beginnings of definitive hematopoietic stem cells // Ann. N.Y.Acad. Sci. 1000.— V.872.— P.256–262.
22. Dzierzak E., Medvinsky A., Bruijn M. Quantitative and qualitative aspects of hematopoietic cell development in the mammalian embryo // Immunology Today.— 1998.— V.19, № 5.— P.228–236.
23. Candidate hematopoietic stem cells from fetal tissues, umbilical cord blood vs. adult bone marrow and mobilized peripheral blood / S.Huang, P.Law, D.Young, A.D.Ho // Exp.Hematol.— 1998.— V.27.— P.1162–1171.

Авторы выражают благодарность Wellcome Trust за предоставление возможности визита в университет Ноттингема для ознакомления с литературой по изучаемой проблеме.

*Редакционная коллегия «Международного медицинского журнала» поздравляет авторов с присуждением Государственной премии Украины в области науки и техники 2002 г. за разработку проблемы трансплантации стволовых клеток (Указ Президента Украины от 16.12.2002 г. №1171/2002).*

24. CD34<sup>++</sup>CD38<sup>-</sup> and CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> human hematopoietic progenitors from fetal liver, cord blood, and adult bone marrow respond differently to hemopoietic cytokines depending on the ontogenic source /S.F.A.Weekx, D.R.van Bockstaele, J.Plum et al.// *Ibid.*— V26.— P.1034–1042.
25. U.S.Department of Health and Human Services.Report to Congress on the status of umbilical cord blood transplantation.— 2000.
26. *Laughlin M.J.* Unbilical cord blood for allogeneic transplantation in children and adults //*Bone Marrow Transplantation.*— 2001.— V27.— P.1–6.
27. Deficient DR antigen expression on human cord blood monocytes: reversal with lymphokines / E.R.Stiehm, M.B.Sztejn, P.S.Steeg et al.// *Clin. Immunol. Immunopathol.*— 1984.— V30.— P.430–436.
28. *Lickliter J.D., McGlave P.B., DeFor T.E.* Matched-pair analysis of peripheral blood stem cells compared to marrow for allogeneic transplantation // *Bone Marrow Transplantation.*— 2000.— V26.— P.723–728.
29. Blood stem cell transplantation factors influencing cellular immunological recinstitution / J.G.Sharp, A. Kessinger, J.C.Lynch et al.// *J. Hematother. Stem. Cell Res.*— 2000.— V9.— P.971–981.
30. Comparison of hematopoietic activities of human bone marrow and umbilical cord blood CD34 positive and negative cells / D.K.Kim, Y. Fujiki, T. Fukushima et al.// *Stem. Cells.*— 1999.— V.17.— P.286–294.
31. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults / H.E. Broxmeyer, G. Hangoc, S. Cooper et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*— 1992.— V. 89.— P. 4109–4113.
32. Normal development of human fetal hematopoiesis between eight and seventeen week's gestation / G.S.Pahal, E.Jauniaux, C.Kinnon et al.//*Am.J.Obstet.Gynaecol.*— 2000.— V.183.— P.1029–1034.
33. *Lu L., Shen R.-N., Broxmeyer H.E.* Stem cells from bone marrow, umbilical cord blood and peripheral blood for clinical application: current status and future application //*Critical Reviews in Oncology/Hematology.*— 1996.— V22.— P.61–78.
34. *Roy V., Miller J.S., Verfaille C.M.* Phenotypic and functional characterization of committed and primitive myeloid and lymphoid hematopoietic precursors in human fetal liver // *Exp.Hematol.*— 1997.— V25.— P.387–394.
35. Фенотип и колониеобразующая активность криоконсервированных клеток эмбриональной печени человека / А.И.Тарасов, Д.Р.Е.Джонс, В.И.Грищенко, А.Ю.Петренко // *Пробл.криобиол.*— 2001.— №3.— С.47–48.
36. Circulation progenitor cells in human ontogenesis: Response to growth factors and replating potential / G. Migliaccio, M.Baiocchi, N.Hamel et al.// *J.Hematother.*— 1996.— V5.— P.161–170.
37. Expansion in bioreactors of human progenitor populations from cord blood and mobilized peripheral blood / G.van Zant, S.A. Rummel, M.R. Koller et al. // *Blood Cells.*— 1994.— V20.— P.482–490.
38. *Medvinsky A., Dzierzak E.* Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by AGM region // *Cell.*— 1996.— V86.— P.897–906.
39. Immunophenotypic and functional characterization of CD33<sup>-</sup> CD34<sup>+</sup> 1 cells in human cord blood of preterm neonates /Cheng-Hao Jin, Hidetoshi Takada, Akihiko Nomura et al.// *Exp.Hematol.*— 2000.— V28.— P.1174–1180.
40. Developmental changes in adhesion molecule expressions in umbilical cord blood CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenic progenitor and stem cells / D.V.Surbek, C.Steinmann, M.Burk et al.// *Am.J.Obstet.Gynecol.*— 2000.— V.183.— P.1152–1157.
41. *Anderson, E.M., Jones D.R.E.* Gestational age and cell viability determine the effect of frozen stor-ageon human fetal hematopoietic progenitor cell preparations // *Fetal Diagn. Ther.*— 1996.— V.11.— P.427–432.

Поступила 27.09.2002

## TRANSPLANTATION OF STEM CELLS — A PROMISING DIRECTION OF THE XXI CENTURY THERAPY 2. STEM HEMOPOIETIC CELLS FROM DIFFERENT SOURCES

A.Yu.Petrenko, V.I.Grischenko

### Summary

The authors present an analytical literature review and the findings of the original research devoted to stem hemopoietic cells obtained from various ontogenetic sources. The prospects of their use for treatment of hemopoietic system pathology are shown.