

*А.С.Брюховецкий, М.А.Шурдов*

**ГЕМОПОЭТИЧЕСКАЯ СТВОЛОВАЯ КЛЕТКА  
В ПАТОГЕНЕЗЕ БОЛЕЗНЕЙ ЦИВИЛИЗАЦИИ,  
ЕЁ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ  
И БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ**

**Андрей Брюховецкий  
Михаил Шурдов**

**Гемопоэтическая стволовая  
клетка в патогенезе  
болезней цивилизации, ее  
диагностические возможности  
и биотерапевтический  
потенциал**

*[http://www.litres.ru/pages/biblio\\_book/?art=68884338](http://www.litres.ru/pages/biblio_book/?art=68884338)  
ISBN 9785005963055*

**Аннотация**

Монография посвящена гемопоэтической стволовой клетке (ГСК) в диагностике и комплексном лечении фатальных заболеваний. Изучена поверхность ГСК и потенциал ее использования в ранней молекулярно-биологической диагностике ряда смертельных заболеваний, а также в оценке возрастной «изношенности» тканей. Разработана инновационная технология биомедицинского клеточного продукта на основе ГСК для лечения рака и нейродегенеративных, аутоиммунных и геронтологических болезней, а также для продления жизни.

# Содержание

Сокращения	5
Об авторах	8
О рецензенте	19
Предисловие	21
Введение	26
Глава 1. Стволовые клетки – мистерии жизни?! (соавт. д.б.н., к.м. н. Л.Ю. Гривцова)	54
Глава 2. Что такое гемопоэтическая стволовая клетка? (соавт. д.б.н.,	84
Глава 3. Состояние проблемы диагностики и лечения фатальных болезней цивилизации	122
Глава 4. Фундаментальные аспекты проблемы: взаимодействие гемопоэтических стволовых и опухолевых клеток <i>in vitro</i> (соавт. д.м. н.	132
Глава 5. Фундаментальные аспекты проблемы: взаимодействие гемопоэтических стволовых и опухолевых клеток на модели глиобластомы <i>in vivo</i> (соавт. д.м. н. И.С. Брюховецкий,	179
Конец ознакомительного фрагмента.	239

**Гемопоэтическая стволовая  
клетка в патогенезе  
болезней цивилизации,  
ее диагностические  
возможности  
и биотерапевтический  
потенциал**

**Андрей Брюховецкий  
Михаил Шурдов**

© Андрей Брюховецкий, 2023

© Михаил Шурдов, 2023

ISBN 978-5-0059-6305-5

Создано в интеллектуальной издательской системе Ridero

# Сокращения

АВС — Автономная вегетативная система

БАС — Боковой амиотрофический склероз

БДН — Болезнь двигательного нейрона

БМКП — Биомедицинский клеточный продукт

БРВ — Безрецидивная выживаемость

БЦЧ — Болезни цивилизации человечества

ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения

ВЭЖХ-МС — Высокоэффективная жидкостная хроматография — масс-спектрометрия

ГКП — Гемопоэтическая клетка-предшественник

ГСК — Гемопоэтическая стволовая клетка

ГЭБ — Гематоэнцефалический барьер

ГОКИ — Гемопоэтически ориентированная клеточно-инженерная

ДВФУ — Дальневосточный федеральный университет

ДК — Дендритные клетки

ЗФР-БСА — Забуференный физиологический раствор — Бычий сывороточный альбумин

ИКК — Иммунокомпетентные клетки

КИ-ДККМ — Клетки, инициирующие долгосрочную культуру клеток костного мозга

КОЕ-ВПП — Культура клеток с высоким потенциалом пролиферации

КПГ — Клетки-предшественники гемопоэза

ЛК — Лейкоконцентрат

ЛТ — Лучевая терапия

МГЪ — Мультиформная глиобластома

МНК — Мононуклеарная клетка

МРТ — Магнитно-резонансная томография

МСКП — Мезенхимальная стромальная клетка-предшественник

МССК — Мезенхимальная стромальная стволовая клетка

НСК — Нейральная стволовая клетка

ОК — Опухолевая клетка



ОСК — Опухолевая стволовая клетка

ПФА — Параформальдегид

СК — Стволовая клетка

тсСК — Тканеспецифические стволовые клетки

ФНО — Фактор некроза опухоли

ХТ — Химиотерапия

ЦНС — Центральная нервная система

ЦТЛ — Цитотоксические лимфоциты

CFDA SE — Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (карбоксихлоресцеин диацетат сукцинимидил эфира)

DAPI — 4',6-diamidino-2-phenylindole (4',6-диамидино-2-фенилиндол)

DMEM — Dulbecco's Modified Eagle Medium (модифицированная по способу Дульбекко среда Игла)

EGF — Epidermal growth factor (эпидермальный фактор роста)

EGFR — Epidermal growth factor receptor (рецептор эпидермального фактора роста)

FBS — Fetal bovine serum (эмбриональная телячья сыворотка)

FGF — Fibroblast growth factor (фактор роста фибробластов)

GFAP — Glial Fibrillary Acidic Protein (глиальный фибриллярный кислый белок)

GM-CSF — Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор)

HGF — Hepatocyte growth factor (фактор роста гепатоцитов)

HIF — Hypoxia inducible factor (фактор, индуцируемый гипоксией)

MCP-1 — Monocyte Chemoattractant Protein-1 (белок-хемоаттрактант моноцитов)

IFN — Interferon (интерферон)

NAD — Nicotinamide adenine dinucleotide (никотинамидадениндинуклеотид)

PBS — Phosphate buffered saline (забуференный фосфатом физиологический раствор, ЗФР)

PDGF — Platelet-Derived Growth Factor (тромбоцитарный ростовой фактор)

SDF-1 $\alpha$  — Stromal cell-derived factor 1 $\alpha$  (фактор стромальных клеток)

TGF- $\beta$  — Transforming growth factor beta (Трансформирующий фактор роста  $\beta$ )

VEGF — Vascular endothelial growth factor (Фактор роста эндотелия сосудов)

## Об авторах



**Андрей Степанович Брюховецкий** – профессор, доктор медицинских наук, ветеран Министерства обороны РФ, полковник медицинской службы в запасе. В настоящее время является генеральным директором АО Клинический госпиталь «НейроВита». Врач-невролог высшей категории, вице-президент Международной ассоциации нейровосстановления (International Association of Neurorestoratology), член редколлегии ряда научных журналов: «Гены и клетки», Journal of Translational Neuroscience and Clinics, Journal of Neurorestoratology. С 1996 по 2002 г. руководил лабораторией высоких технологий НИИ трансплантологии и ис-

кусственных органов им. В. И. Шумакова Минздрава России. С 2003 по 2013 г. был координатором научной отраслевой программы РАМН «Новые клеточные технологии – медицине». С 2002 по 2006 г. возглавлял кафедру клеточной восстановительной медицины ГОУ ВПО «Российский государственный медицинский университет им. Н. И. Пирогова». С 2012 по 2015 г. – руководитель Центра биомедицинских технологий ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр» ФМБА России. Автор 210 публикаций в рецензируемых российских и международных научных журналах, 12 научных монографий в области регенеративной медицины, неврологии, онкологии и 12 глав в коллективных монографиях, а также автор 20 патентов РФ, 5 международных заявок РСТ и патента США.

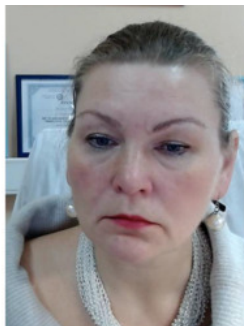
*E-mail:* [neurovita-as@mail.ru](mailto:neurovita-as@mail.ru).



**Михаил Аркадьевич Шурдов** – биолог и биофизик. В настоящее время крупный российский предприниматель, председатель Правления и главный акционер группы компаний «Чебоксарский электроаппаратный завод» (ЧЭАЗ), председатель Правления АО Клинический госпиталь «НейроВита». В 1975 г. закончил Новосибирский государственный университет, получив диплом физика со специализацией «квантовая оптика и радиофизика», принял предложение остаться стажером-исследователем в том же вузе. С 1975 по 1990 г. прошел все ступени научного работника: стажер-исследователь, инженер, младший научный сотрудник, научный сотрудник. В 1985 г. в Институте биофизики СО АН СССР (г. Красноярск) защитил диссертацию и стал

кандидатом биологических наук. Автор 1 научной монографии, более 30 научных публикаций и 15 патентов РФ. Меценат, финансирующий на собственные средства более 22 научных проектов в электротехнике, медицине и биологии.

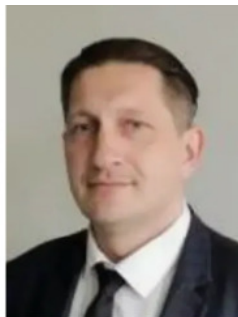
*E-mail:* [neurovita@mail.ru](mailto:neurovita@mail.ru).



**Людмила Юрьевна Гривцова** – кандидат медицинских наук, доктор биологических наук, сертифицированный врач лабораторной диагностики, аллергологии и иммунологии. В настоящее время является заведующей отделом лабораторной медицины, заведующей лабораторией клинической иммунологии МРНЦ им. А. Ф. Цыба – филиала НМИЦ радиологии Минздрава России (г. Обнинск). Закончила Московскую медицинскую академию им. И. М. Сеченова в 1996 г. С 1996 по 2018 г. прошла все ступени научного сотрудника в ведущем онкологическом центре стра-

ны – ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина»: от младшего научного сотрудника до ведущего научного сотрудника и руководителя отдела. Автор более 150 научных публикаций в российских и зарубежных журналах, индекс Хирша 7 (российская информационная база); автор 5 патентов РФ, действующий член редколлегии журналов «Онкогематология» и «Иммунология гемопоеза», член Ассоциации онкологов России и Общества специалистов по поддерживающей терапии в онкологии.

*E-mail:* [gritsova@mail.ru](mailto:gritsova@mail.ru).



**Игорь Степанович Брюховецкий** – доктор медицинских наук, профессор. В настоящее время является главным врачом Медицинского центра ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет» (г. Владивосток). В 2001 г. окончил Владивостокский ГМИ, лечебный факультет. В 2002 г. прошел клиническую интернатуру по спе-

циальности «неврология», в 2002—2004 гг. – клиническую ординатуру по специальности «психиатрия», в 2005—2008 гг. – очную аспирантуру по специальности «неврология». В 2008 г. защитил кандидатскую диссертацию по теме «Механизмы регенерации спинного мозга при трансплантации обкладочных нейроэпителиальных клеток в биополимерном коллагеновом матриксе», в 2017 г. в г. Санкт-Петербурге защитил докторскую диссертацию по теме «Взаимодействие стволовых и опухолевых клеток на модели глиобластомы». Неоднократно проходил международные стажировки в университетах Лозанны (Швейцария), Монпелье и Сорбонны (Франция), Комо (Италия). Автор более 100 публикаций, из них индексируемых Web of Science за последние 5 лет – 37, из которых 9 в изданиях Q1—Q2. Основные направления деятельности: молекулярная, трансляционная, регенеративная и репродуктивная медицина; разработка биомедицинских препаратов для персонифицированной терапии опухолей головного мозга.

*E-mail:* bruhovetsky@mail.ru.



**Игорь Станиславович Долгополов** – доктор медицинских наук, профессор, врач-онколог высшей категории. В настоящее время работает проректором по научной работе в ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России. Окончил в 1994 г. Московскую медицинскую академию им. И. М. Сеченова, ординатуру на кафедре детских болезней. Работал врачом – детским онкологом, старшим и главным научным сотрудником отделения трансплантации костного мозга в НИИ Детской онкологии и гематологии РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, заведовал онкологическим отделением клиники «НейроВита» (г. Москва). В 1999 г. защитил кандидатскую, в 2004 г. – докторскую диссертации по специальности «он-

кология». Автор более 60 печатных работ в российских и зарубежных журналах, более 100 тезисов; соавтор глав в национальных руководствах и нескольких коллективных монографиях. Является научным руководителем 4 кандидатских диссертаций, автором нескольких патентов на изобретения. Проходил стажировки и обучение в клиниках и научных лабораториях Франции, Германии, США. В 2021 г. избран на должность заведующего кафедрой педиатрии ФГБОУ ВО «Тверской государственной медицинской университет» Минздрава России. Член экспертного совета Благотворительного фонда Константина Хабенского; почетный донор России.

*E-mail:* [irdolg@rambler.ru](mailto:irdolg@rambler.ru).



**Олег Игоревич Пак** – врач-нейрохирург высшей катего-

рии, кандидат медицинских наук, доцент. В настоящее время является проректором по медицинским вопросам ФГБОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет» (г. Владивосток). Родился в г. Тойтепа (Узбекистан, Ташкентская область). Там же закончил школу с золотой медалью и поступил в Среднеазиатский медицинский педиатрический университет в г. Ташкенте. После III курса переведен во Владивостокский государственный медицинский институт, где закончил педиатрический факультет в 1994 г. Работал в разных медицинских учреждениях г. Владивостока врачом-нейрохирургом. Был заведующим отделением нейрохирургии, ортопедии и травматологии ГАУЗ «Краевой клинический центр специализированных видов медицинской помощи». Был более 7 лет бессменным главным врачом Медицинского центра ДВФУ. В 2005 г. защитил кандидатскую диссертацию. Неоднократно стажировался и проходил курсы повышения квалификации в Южной Корее, США, Великобритании, Германии, Австрии, Чехии, Японии.

*E-mail:* [o.pak@mail.ru](mailto:o.pak@mail.ru).



**Валерий Евгеньевич Шевченко** – доктор биологических наук, профессор. В настоящее время является ведущим научным сотрудником лаборатории онкопротеомики НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр (НМИЦ) онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, которую он возглавлял более 20 лет. Закончил биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова и прошел все ступени научной карьеры от младшего сотрудника до руководителя лаборатории онкопротеомики ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России. Ведущий специалист страны в области протеомных и постгеномных исследований в онкологии. Автор более 200 научных публикаций в российских и зарубежных журналах, 10 патентов РФ; действующий член редколлегии журнала «Биотерапия»,

член Ассоциации онкологов России.

*E-mail:* [vshev@nm.ru](mailto:vshev@nm.ru).

## О рецензенте



**Георгий Людомирович Менткевич** – доктор медицинских наук, профессор, онколог и гематолог высшей категории. Закончил педиатрический факультет 2-го Московского государственного медицинского института им. Н. И. Пирогова. Прошел все ступени научной карьеры от научного сотрудника до заместителя директора НИИ детской онкологии и гематологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России. Первым в стране начал проводить успешные трансплантации костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток у детей с гемобластозами. Эксперт мирового уровня и ведущий специалист страны в области

трансплантации костного мозга в национальной онкологии. Учредитель Благотворительного фонда «Настенька» для лечения детей с детской онкологией и гематологией. Проходил стажировки и обучение в ведущих детских онкологических клиниках и научных лабораториях США и мира по трансплантации костного мозга. Автор более 150 научных публикаций в российских и зарубежных журналах, 10 патентов РФ; действующий член редколлегии журналов «Детская онкология», «Педиатрия», член Ассоциации онкологов России.

# Предисловие

Читать книги проф., д.м. н. А.С. Брюховецкого, а тем более их рецензировать – это сложная задача, особенно для специалиста, концентрирующегося в своей научной и практической деятельности на какой-то одной или нескольких связанных между собой проблемах. С моей точки зрения, это представление относится в полной мере к книге, которую представили авторы А. С. Брюховецкий и к. б. н. М.А. Шурдов, для обсуждения: «Гемопозитическая стволовая клетка в патогенезе болезней цивилизации, ее диагностические возможности и биотерапевтический потенциал». В написании книги принимали участие признанные эксперты, каждый в своей области, такие как д. б. н. Л.Ю. Гривцова, проф., д.м. н. И.С. Долгополов, проф., д.м. н. И.С. Брюховецкий, к.м. н. О.И. Пак, проф., д.б. н. В.Е. Шевченко. Каждый из них внес весомый вклад в практическое наполнение монографии результатами своих работ и своим представлением о состоянии проблемы, которой они занимаются и в которой они, безусловно, являются авторитетами. Я думаю, что эти главы и разделы будут полезны специалистам, которые занимаются сходными направлениями и хотят в максимально короткий срок получить конкретную информацию о современном состоянии интересующей их проблемы. В первую очередь я бы отнес это к главам, освещающим клиниче-

ские вопросы трансплантации ГСК и описывающим функционал ГСК.

Важным фрагментом монографии является концепция автора о фатальных болезнях цивилизации и роли ГСК в развитии и возможностях диагностики, коррекции, лечения этих состояний. Честно говоря, я не понимаю, почему сердечно-сосудистые заболевания исключены из этого списка. Для меня проблема звучит в несколько иной плоскости, и я бы говорил как об эволюционном характере изменений самого человека как вида (под воздействием множества генетических и эпигенетических факторов), так и о множестве факторов, воздействующих на конкретного человека с момента его зарождения и на протяжении всей его жизни. Даже на примере вирусных инфекций мы можем с уверенностью говорить, что репертуар окружающих нас вирусов существенно меняется: исчезают и мутируют старые, появляются и мутируют новые организмы. При этом этот процесс может происходить достаточно быстро и спонтанно. У людей это происходит медленнее. Однако целый ряд факторов оказывает влияние на течение того или иного заболевания. Когда я начинал работать детским онкологом, считалось, что саркома Юинга не дает метастазов в центральную нервную систему. Правда, все пациенты погибали, как правило, в течение года от начала заболевания. По мере улучшения результатов лечения более 70% пациентов стали выздоравливать, но у некоторых из них развились метастазы в ЦНС.

Это очень примитивный и, возможно, некорректный пример, указывающий, как внешнее воздействие меняет наше представление о течении заболевания. Также хорошо известно, что некоторые вирусные инфекции меняют свою клиническую картину с течением времени. Современные технологии по секвенированию генома позволяют документировать эту изменчивость. У разных этнических групп структура злокачественных заболеваний различная. Интересно, как будет меняться спектр опухолевых заболеваний у людей по мере увеличения числа смешанных браков, а ведь это точно произойдет через какое-то время, только значительно медленнее, чем в случаях с мутациями вируса.

Также у меня вызывает сомнение утверждение, что на основании иммунофенотипа ГСК возможна ранняя, доклиническая диагностика целого ряда заболеваний. Этот комплекс работ нуждается в серьезном подтверждении.

Безусловно, важным разделом монографии являются главы, посвященные освещению вопросов потенциального взаимодействия ГСК и опухолевых клеток. Представлены данные исследований по миграции ГСК *in vitro* как на клеточных линиях, так и на лабораторных животных с моделями опухолей. Подробно приведены данные лабораторных исследований по изучению возможных механизмов взаимодействия ГСК с глиобластомой у лабораторных животных. Эти разделы монографии, а также глава, освещающая различия в протеомике стволовых и опухолевых клеток, наверняка мо-

гут заинтересовать ученых, специализирующихся в изучении фундаментальных механизмов канцерогенеза.

Перспективным направлением изучения роли ГСК в процессе старения организма посвящена одна из глав монографии. Старение ГСК с возрастом точно происходит, и уже сейчас существуют убедительные данные, свидетельствующие о большом потенциале ГСК в замедлении этого процесса.

Последние главы монографии посвящены возможностям создания биомедицинских клеточных продуктов с программированными свойствами. Как неспециалисту в этой области, мне трудно оценивать их научную значимость. С точки зрения клинициста, внедрение этих продуктов в практику будет сопровождаться огромными трудностями с точки зрения подбора пациентов, формирования исследовательских групп, длительности планируемых исследований и, в общем-то, отсутствия интереса у фармакологических компаний и профильных министерств в проведении таких исследований. Развитие этих технологий также сдерживается принятым законом о работе с БМКП в РФ. К сожалению, многие считают, что этот закон стоит также на пути внедрения в лечебную практику персонифицированной клеточной терапии (на основе клеток пациента), которая подтвердила свою эффективность и безопасность при целом ряде тяжелых заболеваний и используется (или использовалась) в рутинной практике ведущих мировых и российских клиник уже более

20 лет. По всей видимости, и эта монография может этому способствовать; настало время для начала процесса научной дискуссии с целью совершенствования имеющегося законодательства по использованию клеточных технологий в персонифицированной медицине.

Таким образом, мне представляется, что рецензируемая монография может быть интересна широкому спектру специалистов в разных областях, каждый из которых может найти для себя что-то полезное и много моментов для возможной критики авторов в интерпретации имеющихся научных знаний.

В заключение мне бы хотелось повторить цитату, используемую авторами для характеристики состояния проблемы и принадлежащую Альберту Эйнштейну, который сказал: «Как много мы знаем и как мало мы понимаем», – и это здорово подходит к описанию феномена гемопоэтической стволовой клетки.

Также мне хотелось бы для читателей, у которых многие разделы монографии могут вызвать вопросы или желание прокомментировать изложенную информацию, с согласия авторов привести адреса электронной почты, по которым они могут это сделать: [neurovita@mail.ru](mailto:neurovita@mail.ru), [bruhovetsky@mail.ru](mailto:bruhovetsky@mail.ru).

*Доктор медицинских наук, профессор Г. Л. Менткевич*

# Введение

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) – это, пожалуй, самые удивительные и самые загадочные клетки в организмах млекопитающих и человека. Они локализованы в нишах красного костного мозга и являются фундаментальной основой всей системы кроветворения (гемопоэза) и иммунной системы (иммунопоэза) организма эукариот, а также родоначальниками и предшественниками всех клеток периферической крови организма у животных и человека. Составляя основу красного костного мозга, имеющего общий вес 1,5 кг, ГСК производят за жизнь человека более 6 т клеточной массы клеток крови. Одна ГСК способна дать сотни триллионов клеток периферической крови и всех клеток иммунной системы человека. Помимо кроветворных функций, ГСК является главной управляющей и регуляторной клеточной системой в организме человека и животных, на которую ориентируются все остальные клетки организма и беспрекословно подчиняются ей в здоровом организме человека и млекопитающих. ГСК является как бы «мамой» всех клеток крови, а также «камертоном» и «дирижером» в ансамбле всей иммунной и кроветворной системы организма человека. Именно эти клетки определяют окончательную судьбу всех пострадавших клеток в организме человека и вершат судьбу большинства тканеспецифических стволовых и прогенитор-

ных клеток в организме, направляя их по пути программной клеточной гибели или восстановления и регенерации. ГСК способна заменить собой любую клетку в организме, стать на ее место и трансформироваться в эту клетку, выполняя все ее функции. Сенсацией в клеточной и молекулярной биологии стали возможности трансформации ГСК в нейральные стволовые клетки (НСК), нейроны, микроглию, астроциты и олигодендроциты и замещения ими зон повреждения почти во всех тканях организма. И наоборот: НСК способна стать ГСК в условиях отсутствия или недостатка собственных ГСК в организме. Но именно управляющие (регуляторные) возможности ГСК стали научным открытием для большинства ученых и показали фантастические возможности этих клеток в биоуправлении и регенерации поврежденных органов и тканей. Это связано с тем, что эти клетки имеют самый медленный клеточный цикл в организме человека (360 дней) и млекопитающих. В соответствии с математической теорией систем, для всех остальных 256 типов известных соматических клеток и тканеспецифических стволовых клеток организма эукариот, они являются управляющими и регуляторными. Как давно известно, «в любом системном процессе управляющей является самая медленная фаза» (Винер, 1964). Поэтому судьба всех клеточных систем организма в условиях нормы подчиняется регуляторным сигналам ГСК и управляется ими. Таким образом, несмотря на то что ГСК являются основным источни-

ком формирования миллиардов клеток крови и всей иммунной системы организма человека и родоначальником всей системы кроветворения у человека и млекопитающих, их роль в биологическом администрировании и биоуправлении гомеостаза, гемопоэза и иммунопоэза в организме является определяющей и системной, и это признается большинством ученых в мире. Таким образом, ГСК является основным системообразующим элементом всей кроветворной и иммунной системы человека, и их повреждение как на уровне генома, так и на постгеномных уровнях во многом определяет весь спектр современных фатальных болезней цивилизации.

С момента открытия ГСК американским ученым российского происхождения проф. гистологии А. А. Максимовым и первых его сообщений в 1908 г. в Берлине на конгрессе гематологов об уникальной роли ГСК в процессе кроветворения, кровообращения и иммунных реакций организма всё вокруг этой клетки было окутано мистикой, тайной и недопониманием их роли в организме человека у ученых во всем мире. Как часто бывает в большой науке, величайшее фундаментальное открытие проф. А. А. Максимова прошло как-то буднично и практически незамеченно для научного мира, и понадобилось почти полвека, прежде чем о нем снова вспомнили и стали использовать это открытие в практических целях – для трансплантации костного мозга. А. А. Максимов первым в мире предложил свое видение схемы кроветворения у человека, где во главе всей клеточной иерархии

стояли ГСК, и его гениальное предвидение и новое понимание роли этих клеток позволило объяснить терапевтические эффекты трансплантации костного мозга, которая стала революционным методом лечения рака и целого ряда аутоиммунных заболеваний в сер. 60-х гг. прошлого века. Но главное достоинство и великое преимущество ГСК перед всеми существующими технологиями лечения сегодня в том, что благодаря трансплантации собственных ГСК при гемобластозах после высокодозной химиотерапии удалось практически в 95% излечить рак у детей и добиться остановки целого ряда тяжелых аутоиммунных заболеваний и еще целого ряда гематологических и онкологических заболеваний.

Центральная и ключевая роль ГСК в процессах кроветворения и иммунопоэза в норме определила их важнейшее место при возникновении и патогенезе патологических процессов при большинстве болезней цивилизации, являющихся основной причиной смертности населения в мире в настоящее время. Именно новое понимание роли и значения ГСК в генезе большинства болезней цивилизации сподвигнуло авторов написать эту книгу, в которой мы попытались изложить свою авторскую точку зрения на роль и место этих клеток в патогенезе онкологических, аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваний. Мы впервые попытаемся показать роль ГСК в патогенезе почти всех нейродегенеративных процессов и показать эти болезни не как болезнь пострадавшего нейрона головного или спинного мозга (болезнь

моторного нейрона при боковом амиотрофическом склерозе или болезнь накопления патологических белков в корковых нейронах при болезни Альцгеймера или других синусопатиях), а как постгеномную (преимущественно протеомную) болезнь собственной ГСК. Наш подход кардинально отличается от существующих точек зрения и научных подходов к этим смертельным заболеваниям в мире, и именно поэтому читателю будет интересно ознакомиться с нашим альтернативным мнением по данной проблеме.

Термин «болезни цивилизации» возник совсем недавно, в конце XX в., и стал в наши дни широко распространенным в медицине. Мировая поисковая система Google на запрос о болезнях цивилизации дает 9480 тыс. сайтов, в которых очень глубоко и серьезно обсуждается эта проблема. Под болезнями цивилизации в настоящее время понимают *заболевания человека, связанные с духовным неблагополучием, нарушением морально-нравственных норм и механизмов адаптации к неблагоприятным факторам антропогенно измененной среды в условиях стремительного роста научно-технического прогресса* (Агаджанян и др., 2003). Столь витиеватое научное определение болезней цивилизации приводится на большинстве сайтов на эту тему и обозначает созданное самим человечеством в процессе научно-технического прогресса необратимое изменение экологии окружающей его природы, приводящее к ответному неблагоприятному и уничтожающему воздействию загрязненной природ-

ной среды на отдельно взятого человека и общество в целом. Болезни человека всегда были тесно связаны с природными условиями его проживания и цивилизационными рисками, которым подвергались люди в определенные этапы истории человечества. Вся история более двухтысячелетнего существования человечества представляет собой определенные периоды и эпохи зарождения, развития, расцвета, надлома, разложения и исчезновения цивилизаций от естественных катастроф, военных поражений или внутренних конфликтов. Стадии надлома и разложения цивилизации сопровождаются, как правило, увеличением числа заболеваний, характерных для каждой эпохи. Однако смена цивилизаций на ранних этапах существования человечества, несмотря на глобальные эпидемии тяжелых инфекционных заболеваний и разрушительные войны, уносящие миллионы жизней людей, никогда ранее не угрожала основам жизни человечества на Земле и фундаментальным основам цивилизации, как это происходит сегодня. В настоящее время человечество стоит на грани собственного выживания и вымирания. Как утверждают ведущие эксперты в этой области знаний (Агаджанян и др., 2003), на современном этапе перехода западной цивилизации в постиндустриальное пространство люди столкнулись с реальной возможностью самоуничтожения человечества, поскольку преобразующая сила общественного производства стала сравнима по мощи с неуправляемыми природными процессами и катастрофами. В связи

с этим человечество встало перед необходимостью решения таких глобальных мировых проблем, как предотвращение мирового глобального потепления, недопущение мировой термоядерной войны, прекращение гонки вооружений среди развитых и развивающихся государств, изучение космоса и недопущение выведения в космос оружия массового поражения, охрана здоровья и ликвидация наиболее опасных заболеваний, установление неблагоприятных последствий научно-технической революции (НТР) и экологического кризиса. Проявлениями последнего являются изменения, угрожающие естественной основе жизни человека и негативно воздействующие на развитие общества: опасность изменения генетического фонда, недостаточная энергетическая, ресурсная и продовольственная обеспеченность, демографический дисбаланс, растущая загрязненность окружающей среды. Два самых крупных источника кислорода – тропические леса и Мировой океан – находятся под угрозой исчезновения и необратимого загрязнения, что, несомненно, скажется на здоровье всей мировой популяции людей.

В Индийском океане плавают острова из неразлагаемых производственных отходов и бытового мусора размерами в десятки километров, которые привели к необратимому изменению флоры и фауны океанов и морей. Австрийский зоолог и специалист в области экологии К. Лоренц (1991) считает подобные действия человечества общественным психическим заболеванием, «коллективным помешательством»

и связывает эти факты с тем, что люди, «опьяненные своими технологическими победами», делают глупости, прилагая технические средства к живой природе и разрушая таким образом основы собственной жизни и существования цивилизации.

В связи с таким глобальным и губительным комплексом негативных явлений для населения мира, их всемирным масштабом, актуальностью и динамизмом экологических проблем возникает опасность перерастания экологического кризиса в экологическую катастрофу вселенского масштаба. Сегодня населению планеты Земля предоставлен выбор: либо разумное управление дальнейшим социальным прогрессом, либо гибель цивилизации. Проблема выбора стратегии человеческой деятельности попадает в разряд жизненно важных мировых опций для выживания всего человечества. Результатом развития индустриального общества явилась потеря человечеством инстинкта самосохранения. Разные проявления современного кризиса индустриального и постиндустриального общества выглядят как симптомы медленного «наркотического» вползания человечества в необратимые самоубийственные процессы самоуничтожения и саморазрушения самих устоев его жизни. Ресурсоемкость основанного на научной технологии стиля жизни превышает естественные ограничения нашей среды обитания. Практиковать этот стиль жизни можно лишь за счет других живущих на Земле людей и за счет потомков. В на-

стоящее время так живут почти 13% населения Земли. Они поглощают ок. 70% невозобновляемых ресурсов и выбрасывают такую же долю загрязняющих веществ.

Мы понимаем, что мы не политики и не экологи и вряд ли сами сможем изменить или остановить столь существенный вред здоровью человечества, нанесенный неблагоприятной мировой экологией, но мы врачи и биологи, и мы можем предложить биомедицинские технологии для того, чтобы профилировать основные болезни цивилизации, чтобы выявлять их на ранней стадии, до появления клиники, и чтобы увеличить продолжительность жизни человека, несмотря на его разрушение мировой экологии. Как ни ортодоксально это звучит, но фундаментальной научной основой, базовой технологией и основным специализированным инструментом для ультраранней диагностики, профилактики и лечения БЦЧ может стать именно собственная ГСК человека. Наш многолетний опыт экспериментального и клинического применения ГСК показал, что эти клеточные системы человека как системообразующие элементы кроветворной и иммунной систем организма человека почти всегда, с одной стороны, подвергаются воздействию неблагоприятных экологических факторов окружающей среды, а с другой стороны, обусловлены морфологическими изменениями, происходящими в организме человека. Оказалось, что не столько генетические, сколько постгеномные (протеомные, транскриптомные, метаболомные и секретомные) нару-

шения в клетках и тканях определяют возникновение, течение и смертельный исход БЦЧ.

Заболевания цивилизации человека, связанные с результатом развития индустриального общества: «экономикой дымных труб», информатизацией, социальными изменениями, радиационной ситуацией на планете, лечением лекарственными препаратами, а также с порочными наклонностями, – выходят на первый план здоровья населения всей планеты. Формально первопричина всех болезней цивилизации лежит в дисбалансе отношений человека с природой. Наукой еще не раскрыта вся специфика биологических основ существования человека, однако накоплено много фактов о наследственности и изменчивости его признаков. Например, ослабление сопротивляемости человеческого организма болезням и как следствие увеличение количества мутаций и генетических дефектов в 2,5 раза за последние 30 лет стали причиной необратимых эпигенетических модификаций и постгеномных изменений клеток в организме человека.

Не подлежит сомнению тот факт, что медицина оказала особое влияние на судьбу человечества. Во многом благодаря ее заслугам существенно изменилась демографическая ситуация. Побеждены заболевания, порождавшие массовые инфекционные эпидемии (чума, натуральная оспа). В результате открытия новых терапевтических методов (антибиотиков, противовирусных препаратов, молекулярно-на-

целенных противоопухолевых препаратов и т.д.) значительно увеличилась продолжительность жизни людей. Найдены способы лечения болезней, считавшихся прежде неизлечимыми. Однако на смену побежденным болезням приходят новые, более жестокие и изощренные по форме, мимикрирующие, стремящиеся обмануть иммунную систему.

К группе болезней цивилизации относят патологии сердечно-сосудистой, нервной, иммунной, пищеварительной, эндокринной систем. Из них сердечно-сосудистые, онкологические, легочные болезни и сахарный диабет прочно заняли ведущие места среди причин смертности, инвалидности и временной нетрудоспособности у населения всего мира. Что же заставляет выделять эти заболевания в отдельную группу? С начала XX столетия уровень заболеваемости болезнями цивилизации стал расти в геометрической прогрессии. Сегодня мы очень много знаем об этих болезнях, но абсолютно не можем их своевременно диагностировать и не можем лечить данные заболевания.

Однажды Альберт Эйнштейн произнес ставшую крылатой фразу: «Как много мы знаем и как мало мы понимаем!» Надеемся, что данная монография продемонстрирует эту неопровержимую аксиому, высказанную одним из гениев человечества в сер. 60-х гг. прошлого века, и покажет, что мы действительно располагаем очень большим количеством важных знаний и инновационных технологий, которые могут быть использованы совсем в новом качестве, в но-

вом научном контексте и с новыми стратегическими целями и тактическими задачами, если у нас будет новаторское понимание существующей проблемы и будет альтернативная теория, объясняющая по-новому давно известные научные факты о болезнях цивилизации.

В этой книге мы попытаемся сделать ревизию старых научных представлений об этиопатогенезе основных фатальных заболеваний цивилизации и под напором полученных знаний последних двух десятилетий XXI в. и собственных экспериментальных научных фактов попытаемся изменить существующие традиционные научные взгляды специалистов – онкологов, неврологов, иммунологов и кардиологов на механизмы возникновения, диагностики и течения целого ряда фатальных (смертельных) онкологических, нейродегенеративных и аутоиммунных заболеваний человека. Также мы попытаемся на собственном материале показать и доказать, что большинство смертельных болезней цивилизации человечества не являются болезнями определенных тканеспецифических клеток организма, как это общепризнано в современной медицине, а являются нозоспецифичным проявлением системной постгеномной болезни аутологичной гемопоэтической стволовой клетки (ГСК) организма больного и ее потомков. Также в этой книге мы попытаемся доказать читателям, что такое широко известное и неизлечимое нейродегенеративное заболевание, как боковой амиотрофический склероз (БАС, или его другое название – бо-

лезнь двигательного нейрона, БДН), лишь на поздних стадиях заболевания является болезнью моторного нейрона, а изначально это протеомное заболевание собственной ГСК человека, полученное в результате различных этиологических факторов данной болезни. Мы установили (Брюховецкий, Гривцова, 2019), что изначально это заболевание обусловлено специфичными изменениями протеомной структуры ГСК, а повреждение моторного нейрона головного и спинного мозга и болезнь моторного нейрона – это не причина болезни, а ее следствие. И это новое знание открывает принципиально новые горизонты для терапии этого неизлечимого в настоящее время и смертельного заболевания. Новый взгляд на патогенез этого заболевания с позиций протеомики ГСК позволяет предложить универсальное лечение, способное остановить эту страшную болезнь на время или даже полностью. Аналогичная ситуация и с широко известным аутоиммунным заболеванием под названием сахарный диабет I типа, которое не должно сводиться исключительно к болезни  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, а является, на наш взгляд, первично патологией протеомной структуры ГСК, обуславливающей гиперреактивность собственных ГСК пациента, и только затем аутоагрессивные иммунокомпетентные клетки крови приводят к повреждению  $\beta$ -клеток поджелудочной железы. Далее, основываясь на этом механизме постгеномных изменений ГСК, мы покажем возможности ранней диагностики и молекулярно-нацеленной терапии болез-

ни Альцгеймера, системной корковой атрофии и других нейродегенеративных заболеваний цивилизации!

Другими словами, в этой книге была предпринята попытка, используя уже хорошо известные знания и существующие или незначительно модифицированные нами биомедицинские технологии иммунологии, онкологии, неврологии, трансплантологии, клеточной биологии, молекулярной биологии и клеточной инженерии, показать, как на основании нового теоретического понимания неразрешимой научной проблемы формирования канцерогенеза, нейродегенерации и аутоиммунного процесса можно сформулировать принципиально новый и достаточно универсальный методологический и научно-практический подход к действительно ранней молекулярно-биологической диагностике и персонализированному лечению основных фатальных болезней цивилизации. Мы считаем, что такие смертельные и неизлечимые заболевания цивилизации, как рак и другие злокачественные онкологические заболевания (гемобластозы, лимфопролиферативные болезни, меланома, мультиформная глиобластома и т.д.), нейродегенеративные болезни (болезнь Альцгеймера, деменция, болезнь Паркинсона, БАС, БАС-деменция и т.д.) и аутоиммунные заболевания (сахарный диабет I типа, миокардиодистрофия, системная красная волчанка, ревматизм, рассеянный склероз и др.), имеют общее биологическое патогенетическое начало в изменении геномнопостгеномной структуры ГСК больного человека и эта общая

биология разновекторных повреждений протеомной структуры ГСК при этих заболеваниях лежит в основе формирования базовых патологических иммунных механизмов этих болезней, понимание которых позволит получить принципиально новый и прорывной результат в персонализированной медицине и науках о жизни. ГСК как родоначальница всех клеток иммунной системы и системы кроветворения в организме человека может стать ключом к молекулярно-биологической диагностике этих заболеваний и инструментом к их полному излечению, если основываться на имеющихся и получать новые постгеномные знания о патологии структуры протеома ГСК человека.

Эта научная монография посвящена не столько объяснению и доказательству фундаментальной роли патологии собственной ГСК и ее потомков в организме человека в формировании практически всех основных видов (онкологических, аутоиммунных, эндокринных и нейродегенеративных) смертельных болезней цивилизации человечества, сколько в демонстрации нового понимания причинно-следственных механизмов возникновения и течения этих заболеваний у человека. Мы в результате собственных протеомных исследований установили и показали, что именно патоспецифические белковые изменения в постгеномной (транскриптомной, протеомной, метаболомной и секретомной) структуре ГСК являются определяющими в судьбе тканеспецифических клеток в организме человека и определяют вектор

развития того или иного фатального заболевания цивилизации. Понимание постгеномных механизмов процессов, произошедших в аутологичных ГСК, может обеспечить возможность ультраранней диагностики и эффективной терапии основных смертельных болезней человеческой цивилизации. Сегодня эти болезни смертельны и неизлечимы, и, возможно, во многом это связано с нашим ошибочным пониманием причинно-следственных отношений в развитии и динамике патогенетических процессов при этих болезнях и той роли, которую в них играют собственные ГСК и их потомки.

Исторически и традиционно сложилась клиническая ситуация, что основными фатальными болезнями цивилизации занимаются врачи разных специальностей. Опухолями и раком занимаются исключительно онкологи и гематологи, нейродегенеративными заболеваниями – исключительно неврологи и психиатры, а аутоиммунными заболеваниями – преимущественно кардиологи, ревматологи, иммунологи, неврологи, эндокринологи, дерматологи, ЛОР-специалисты, офтальмологи и врачи еще самых разных специальностей. Поэтому общей точки зрения на патогенез этих заболеваний нет и в принципе быть не может. Каждый из специалистов считает, что именно повреждение специализированных органных высококодифференцированных тканеспецифических клеток у пациента с этими заболеваниями является ведущим и центральным в клинической картине болезни и определяет ее клиническую манифестацию. Так, со-

временные ревматологи убеждены, что причиной ревматоидного артрита, полимиозита и системной красной волчанки являются патологические процессы в специализированных клетках соединительной ткани. Эндокринологи отдают приоритет при тиреоидите повреждениям специализированных клеток щитовидной железы, а при сахарном диабете I и II типов – повреждению  $\beta$ -клеток поджелудочной железы. Неврологи убеждены, что большинство неврологических болезней цивилизации связаны с вовлечением в патологический процесс высокоспециализированных клеток мотонейронов при боковом амиотрофическом склерозе, с повреждением дофаминергических нейронов в стриопаллидарном отделе головного мозга при болезни Паркинсона, а при болезни Альцгеймера у пациента страдают преимущественно нейроны коры головного мозга и т. д. Онкологи убеждены, что проблема возникновения их заболеваний связана с развитием канцерогенного процесса в различных клетках организма человека. При этом роли иммунной системы в развитии этих заболеваний никто из вышеперечисленных специалистов не отрицает и уделяет ей важнейшее значение в патогенезе заболевания. Никто не отрицает, что в результате всех болезней цивилизации в цитоплазме и ядре специализированных клеток накапливаются патологические белки: при злокачественных новообразованиях (ЗНО) это онкоспецифические белки, при нейродегенеративных заболеваниях также накапливается огромное количество тканеспецифических белков

(таупатии, синусопатии и т.д.), и эти болезни даже стали классифицировать как болезни накопления. При этом ни один из узких врачей-специалистов не готов признать очевидный факт: что органоспецифическое и (или) тканеспецифическое повреждение высококодифференцированных клеток и тканей манифестирует только тогда, когда большая часть органа уже безвозвратно пострадала. Так, в ряде случаев, при высокой пластичности нервной ткани, может быть повреждено более 70—80% нейронов, а клинической манифестации заболевания не отмечается. Но ведь эта фатальная болезнь появилась не вчера, она тянулась годами, и мы были просто неспособны ее диагностировать и остановить на ранних этапах ее формирования. Основоположник сосудистой хирургии Рене Лериш совместно с ученым-морфологом Клодом Бернаром при описании вегетативной жизни тканей еще в 1915 г. в книге «Этюды сосудистой хирургии» обращал внимание на это несоответствие степени морфологического повреждения тканей и клиники и предполагал, что в будущем будут найдены инструменты ранней диагностики асимптомных морфологических изменений в тканях и органах человека при бессимптомном течении болезни. Мы полагаем, что подобным инструментом, о котором говорили эти великие ученые, могут стать фенотипические особенности ГСК и молекулярно-биологический анализ мембранной поверхности экспрессии антигенов на ГСК. Именно изучение постгеномных характеристик ГСК и ее потом-

ков при целом ряде фатальных болезней цивилизации стало фундаментальной молекулярно-биологической основой, которая позволила объединить нам эти, казалось бы, несопоставимые смертельные болезни цивилизации в единый континуум болезней и увидеть системные закономерности, их между собой объединяющие. На первый взгляд кажется, что между этими тяжелыми и неизлечимыми заболеваниями не может быть в принципе ничего общего. Это болезни из т.н. разных врачебных специальностей и разных классов болезней, систематизируемых по Международной классификации болезней X пересмотра (МКБ-10). Но это именно то обстоятельство, что не позволяет их диагностировать на самом раннем этапе и найти способ вылечиться от них.

Давайте посмотрим на эти фатальные болезни современного человечества с общетеоретических и общесистемных позиций и обобщим имеющиеся знания. Во-первых, долгое время считалось, что все онкологические болезни, эндокринные заболевания, нейродегенеративные болезни и аутоиммунные болезни – это болезни специализированных высокодифференцированных клеток различных тканей и органов. Онкологические заболевания обусловлены появлением онкологических клеток определенной ткани, содержащих онкоспецифические белки этой ткани, где локализована опухоль; а нейродегенеративные заболевания являются болезнями накопления нейроспецифических белков в нейронах различной локализации (тау-белков в корковых нейронах).

нах при болезни Альцгеймера и системной корковой атрофии, FUS-белков и TDP-43 при боковом амиотрофическом склерозе или телец Леви в нейронах стриопаллидарной зоны мозга при болезни Паркинсона и т.д.). Другими словами, было общепризнанно, что эти болезни всегда определены патогенетическими изменениями дифференцированных тканеспецифических клеток различных органов и тканей. Именно поэтому для ранней диагностики этих заболеваний применяют исключительно молекулярные маркеры, характерные для распада клеток определенной ткани, и молекулярные маркеры этих болезней, которые всегда тканеспецифичны. Уже с конца 2000-х гг. появилась новая концепция возникновения рака и утвердилась новая научная точка зрения: что рак – это генетическое заболевание ядра тканеспецифической стволовой клетки (Заридзе, 2004). То есть в основе этих болезней лежит генетическое и постгеномное повреждение ядра недифференцированной незрелой стволовой клетки (СК) или клетки-предшественники (КП). Сегодня роль повреждения тканеспецифических СК также отмечена и при целом ряде аутоиммунных и нейродегенеративных болезней (Брюховецкий А. С. и др., 2018). Во-вторых, как мы отметили ранее, во всех этих пострадавших клетках этих тканей идет накопление патологических белков: онкоспецифические белки накапливаются в опухолевых клетках при раке и почти при всех злокачественных онкологических заболеваниях (меланоме, глиобластоме, сар-

коме и т.д.); при нейродегенеративных болезнях – тау-белки накапливаются в клетках коры при болезни Альцгеймера и системной корковой атрофии, FUS- и SOD1-белки накапливаются при БАС-деменции и при БАС, тельца Леви накапливаются при болезни Паркинсона; и при всех аутоиммунных заболеваниях в пострадавших тканеспецифических (нервной ткани, соединительной ткани, эндокринных органов и т.д.) клетках идет накопление патологических белков. Эта особенность вышеуказанных болезней также стала их важным диагностическим маркером. Почти все нейродегенеративные болезни стали называть болезнями накопления патологических белков. Но почему-то только нейродегенеративные болезни называются болезнями накопления, а при остальных заболеваниях этот факт протеомного накопления патологических протеинов широко известен, но якобы не является фундаментальным и определяющим. В-третьих, системообразующим фактором возникновения этих заболеваний является их полиэтиологичность, когда под воздействием одних и тех же факторов экзогенной и эндогенной среды (травмы, стрессы, психогении, пищевые отравления, бактериальные и вирусные инфекции, хронические интоксикации ядами и лекарствами, возрастные изменения и т.д.) формируется нарушение гемато-тканевого барьера, происходят выход лейкоцитов в поврежденные специализированные ткани, эксайтотоксический стресс специализированных клеток, а также приход тканеспецифических стволовых ре-

гионарных клеток и затем ГСК и гемопоэтических прогени-  
торов. Это приводит к локальному асептическому воспали-  
ению в тканях и к первичным и вторичным иммунным реак-  
циям в них, к включению механизмов врожденного и при-  
обретенного иммунитета. Это абсолютно закономерная фи-  
зиологическая реакция иммунологической защиты организ-  
ма на действие экзогенных или эндогенных антигенов, и, как  
правило, нормальная иммунологическая реакция заверша-  
ется восстановлением гомеостаза и внутриклеточного балан-  
са. Этому учили нас наши преподаватели в высших медицин-  
ских учебных заведениях на учебных циклах нормальной  
и патологической физиологии и патологической анатомии.  
Нашими великими предшественниками в изучении каждой  
из этих болезней были предложены и описаны блестящие  
механизмы иммунной защиты от бактериальных, вирусных,  
микотических и онкологических антигенов, а также анти-  
генов из простейших микроорганизмов. Почему же тогда  
совершенные механизмы инфекционной иммунологии, бле-  
стяще работающие при инфекционных и вирусных заболе-  
ваниях, не работают так же эффективно при фатальных за-  
болеваниях цивилизации?

Это связано с тем, что в целом всё, что написано в об-  
ласти современной иммунологии, в том числе механизмы  
стимуляции и активации иммунитета, касается преимуще-  
ственно инфекционной иммунологии. Основными инстру-  
ментами в инфекционной иммунологии являются здоровые

клетки врожденного и приобретенного звеньев иммунной системы человека, которые вырабатывают определенные гуморальные факторы и количественные параметры клеточно-гуморальных звеньев, создающие иммунологические ответные реакции на антигены, отработанные годами человеческих эпидемий от инфекционных и вирусных болезней, четкие механизмы иммунологического первичного и вторичного ответа и т. д. А также они представлены здоровыми ГСК и гемопоэтическими прогениторными клетками. При аутоиммунных, нейродегенеративных и онкологических заболеваниях мы столкнулись с качественно новой иммунологией. Мы условно определили ее как «иммунологию болезни цивилизации».

Вот посмотрите, например, основные и фундаментальные отличия иммунного ответа на патологический антиген при опухоли от ответа при инфекции:

1. Любая стимуляция собственных резервов иммунокомпетентных клеток человека при опухолях неспособна полноценно обеспечить противоопухолевую функцию его иммунной системы и обеспечить требуемую элиминацию избыточного количества опухолевых клеток (ОК), как при инфекционных заболеваниях.

2. Нет системного и скоординированного реагирования иммунной системы на избыточное количество ОК или реакция парадоксальная и редуцированная; нет первичного и вторичного иммунного ответа на онкогены (Аг).

3. Нет наработки специфичных антител (Ат), а АТ стимулируют рост опухоли.

4. Нет продуктов взаимодействия онкогена (Аг) с антителом (Ат) в виде циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), а также фиксации их в тканях и тканевого повреждения.

5. Нет достаточной генерации цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ).

6. Слабая киллерная реакция эффекторных клеток врожденного иммунитета на ОК вследствие иммунотолерантности.

Иммунная система распознает опухоль только тогда, когда она состоит из  $> 10^9$  ОК. Такая же парадоксальная реакция отмечается при аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваниях. Сначала иммунная система в них отвечает формированию первичного и вторичного иммунного ответа, который становится гиперреактивным, и собственные клетки начинают разрушать дифференцированные клетки. Но здесь мы не будем останавливаться на этом подробно, мы к этому еще вернемся далее в тексте книги.

Сегодня очевидно, что при большинстве болезней цивилизации человек как вид не имеет специализированной системы борьбы с раком, нейродегенеративным заболеванием и с аутоиммунными нарушениями, например такой, какая у него есть при инфекционных (бактериальных и вирусных) заболеваниях, т.е. в геноме его клеток отсутствует про-

грамма противоопухолевой, аутоиммунной и нейрорегенеративной защиты от этих фатальных болезней. У человека не существует специфичных межклеточных и тканевых системных программных механизмов иммунного реагирования на избыточное появление опухолевых клеток ( $> 10^5$  ОК, но  $< 10^9$ ), как при инфекции, и иммунный ответ слабый и появляется, когда количество ОК  $> 10^9$ . Но при этом он успешно живет достаточно длительное время, пока не «доживет до своего рака» или не «дотянет до своей болезни Альцгеймера». Оказывается, многие годы организм блестяще справляется с большинством неблагоприятных факторов окружающей среды и способен противостоять им. С чем это связано? Мы считаем, что это связано с его ГСК, которые с возрастом значительно уменьшаются в количестве, и с их структурной протеомной перестройкой под воздействием неблагоприятных факторов окружающей среды и нарушений внутреннего гомеостаза. Мы попытаемся доказать в этой книге, что большая часть болезней цивилизации обусловлена истощением собственных ресурсов ГСК в организме и развитием постгеномных, преимущественно протеомных заболеваний собственных ГСК человека.

Уклонение клеток от иммунного надзора – это проявление общей иммунотолерантности ГСК и гемопоэтических клеток-предшественников (ГКП) онкологического больного, а гиперреактивность иммунной системы при аутоиммун-

ных и нейродегенеративных заболеваниях – это все разные стороны повреждений протеомной структуры ГСК. По-видимому, в одном варианте при основных болезнях цивилизации только полная замена пострадавших ГСК на аллогенные иммуносовместимые донорские ГСК позволит остановить эти заболевания. А в другом варианте только искусственное редактирование генома ГСК и их потомков – иммунокомпетентных клеток (ИКК) может обеспечить возможность запрограммировать противоопухолевое иммунное гиперреагирование на избыточное появление ОК или иммунное гипореагирование ГСК и их потомков при аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваниях. Основными кандидатами для редактирования генома ИКК должны стать аутологичные ГСК и ГКП пациентов. При невозможности редактирования генома ИКК являются инструментами иммунотерапии. Очевидно, что для онкологического пациента могут быть осуществлены молекулярно-генетический подбор аллогенных ИКК, модификация собственных ИКК и дополнительное лекарственное расширение (цитокины, хемокины и т.д.) противоопухолевых возможностей ИКК.

Иммунология болезней цивилизации, как мы ее обозначили ранее, другая и отличается от иммунологии инфекционных болезней не только количественными характеристиками клеток и гуморальных факторов во время иммунных ответов, скоординированностью и системностью их реагирования, а принципиально другими качественными харак-

теристиками изменения белковой структуры ГСК и их потомков. Клеточные и гуморальные факторы как врожденно-го, так и приобретенного иммунитета находятся в количественном балансе при большинстве болезней цивилизации и практически не отличаются от нормы, но их качественные параметры (геномно-протеомная структура) и функции этих клеток отличаются от здоровых клеток кардинально.

Уже более 20 лет наша научно-исследовательская группа активно изучает биологическую природу ГСК человека, ее потенциальные возможности в нейрорегенерации, восстановительном лечении и онкологической практике, и мы достаточно широко применяем их в системе комплексного лечения целого ряда неврологических, онкологических и нейроонкологических заболеваний. В 2005 г. Росздравнадзор выдал, а в 2006 г. продлил нам первое в мире регистрационное удостоверение на новую медицинскую технологию «Способ применения гемопоэтических стволовых клеток для лечения последствий травматической болезни головного и спинного мозга у человека». Ранее мы запатентовали эту технологию и уже более 17 лет применяли ее в клинической практике с хорошей эффективностью для лечения посттравматических заболеваний у более чем 18 тыс. пациентов со всего мира.

Но только спустя 17 лет нашего использования ее в онкологической и неврологической клинике к нам пришло принципиально новое понимание того, как работают эти клетки

и какие возможности для диагностики они открывают перед врачами, и в этой книге мы хотим поделиться с читателями нашими соображениями и полученными результатами.

Книга написана достаточно стандартно для научной монографии. Состоит из введения, основных глав, раскрывающих возможности использования ГСК для диагностики и лечения, и заключения. Основным достоинством книги мы считаем возможность описать потенциал применения ГСК как в целях диагностики большинства фатальных заболеваний, так и в целях предложенной нами технологии создания специализированных БМКП на основе клеточно-инженерной линии аутологичных ГСК, полученных путем перепрограммирования соматических клеток негемопоэтического ряда (фибробластов, адипоцитов, нейронов, нейроглиальных клеток) с использованием технологии химической индукции малыми молекулами.

Авторы выражают большую благодарность сотрудникам своих подразделений медицинских учреждений, активно участвовавшим на различных этапах научных исследований по этой научной тематике, а также коллективу клинического госпиталя «НейроВита».

Все замечания и предложения читателей по поводу данной книги просим высылать на электронную почту по адресам: [neurovita-as@mail.ru](mailto:neurovita-as@mail.ru), [bruhovetsky@mail.ru](mailto:bruhovetsky@mail.ru) и [irdolg@rambler.ru](mailto:irdolg@rambler.ru).

*Авторы*

# **Глава 1. Стволовые клетки – мистерии жизни?! (соавт. д.б.н., к.м. н. Л.Ю. Гривцова)**

На протяжении многих десятков лет в мире присуждаются высшие премии за передовые и новаторские исследования в науке, медицине и биологии. Одной из таких самых престижных мировых премий за выдающиеся достижения в области биологии и медицины является Нобелевская премия. Однако, как это ни покажется странным, среди ее престижных номинантов нет (за исключением японских исследователей К. Такахаши и С. Яманака (Takahashi, Yamanaka, 2006) ученых, посвятивших свою жизнь изучению стволовых клеток (СК).

Что же собой представляют таинственные стволовые клетки? Почему их открытие сначала было не замечено научным сообществом, а затем, почти через 100 лет, привело к революции в биологической науке и глобальному научно-медицинскому прорыву в медицине, с одной стороны, а с другой стороны, послужило глубокому расколу в научных представлениях и в понимании их роли в биологии и медицине между различными мировыми научными школами ученых и клиницистов?

Почему сегодня именно СК рушат фундаментальные дог-

мы биологии и медицины и целые школы академических ученых отводят им центральное место во всех системообразующих и фундаментальных процессах организма эукариот? Почему большая часть мировых ученых считает СК биологическим фундаментом жизни и основой регенерации органов и тканей млекопитающих, птиц и человека, а с другой стороны, отдельные, высокопрофессиональные мировые ученые заявляют, что СК – это фантом, главная мистификация и «мировой блеф» современной науки? И этих необъясненных «почему», связанных с понятием «стволовые клетки», сегодня так много, что сам этот термин стал жить своей независимой жизнью как в науке и средствах массовой информации, так и в нашем обществе.

Очевидно, что сегодня о СК знает каждая домохозяйка и имеет о них свою собственную точку зрения. Спросите любого политика и политтехнолога, что такое СК, и вы получите исчерпывающий ответ, зависящий от того, какую из вышеперечисленных точек зрения на СК он занимает. Будущее применения СК достаточно туманно и неопределенно. В одних случаях будущее наук о жизни различными мировыми учеными связывается с перспективой «выращивания из СК органов и тканей человека» (Сухих и др., 2020), а также они рассматриваются как средство «продления продолжительности жизни» и «улучшения качества жизни человека и всего человечества» (Брюховецкий А. С., 2003, 2021). В других случаях термин «стволовые клетки» стал синонимом шарла-

танства, обмана и лженаучности. Он стал «токсичен» как для целого поколения ученых и врачей, так и просто для людей, работающих в науке и находящихся вне ее. Многие обыватели очень боятся лечения стволовыми клетками, т.к. миф о том, что они вызывают рак и другие злокачественные опухоли, стал неотъемлемой частью «информационной ауры» вокруг СК.

И все же у значительного большинства современных мировых ученых термин «стволовые клетки» стал перспективным символом современного научного прогресса и новых горизонтов в науке вообще и в биологии и медицине в частности. Возможно, парадоксы терминологии СК связаны с неординарной историей их открытия и с глобальными методологическими ошибками их первоначального клинического применения и использования в медицине. Сам термин «стволовые клетки» в настоящее время представляется крайне неоднозначным.

И все же что такое стволовые клетки, согласно классическому научному представлению? Это гетерогенная популяция наивных недифференцированных клеток, находящихся на вершине иерархической лестницы необратимых клеточных дифференцировок. Такая точка зрения оказала влияние на то, как сейчас проводятся исследования стволовых клеток (СК), и объясняет то, чего мы можем от них ожидать в практическом смысле. Немного переиначивая вышесказанное, можно утверждать, что СК – это гетерогенная по-

пуляция недифференцированных клеток, которые присутствуют на эмбриональной и взрослой стадиях жизни и дают начало дифференцированным, зрелым тканеспецифическим клеткам, строительному материалу органов и тканей организма. В послеродовом периоде и в течение зрелой жизни немногочисленные тканеспецифические стволовые клетки (СК взрослых, СКВ, adult stem cells) обнаруживаются в различных органах и системах и играют важную роль в восстановлении органа после повреждения.

Основными характеристиками СК являются самообновление и самоподдержание (способность к интенсивному размножению с сохранением небольшого пула исходно недифференцированных клеток), из чего вытекают такие их свойства, как клональность (обычно возникающая из одной клетки) и мультипотенциал, или мультипотентность (способность дифференцироваться в разные клеточные типы). Следует учитывать, что клональность СК не имеет отношения к патологической клональности. Термин определяет их особенность формировать клон нормальных (не патологических) клеток с практически схожими свойствами. Эти свойства могут отличаться у различных СК. Например, эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), полученные из бластоцисты, обладают высокой способностью к самообновлению и значительным дифференцировочным потенциалом, в то время как у тканевых СК возможности самообновления и дифференцировки ограничены тканеспецифическими

рамками потенциала этих клеток.

Вместе с тем постепенно накапливаются факты, заставляющие нас менять парадигму наших представлений относительно СК. Например, в некоторых исследованиях предполагается, что интестинальные стромальные клетки могут заменить СК, обновляющие слизистую оболочку кишечника (Теттех и др., 2016); подтверждением тому также являются работы С. Яманаки (Takahashi, Yamanaka, 2006), демонстрирующие возможность программирования дифференцированных клеток в подобие стволовых клеток. Такая пластичность предполагает, что «стволовость» может не ограничиваться какой-то одной определенной популяцией клеток, и побудила некоторых биологов более глубоко задуматься над вопросом, что такое СК на самом деле.

Традиционные представления о СК возникли в результате исследований кроветворной ткани в костном мозге, где клетки крови образуются у взрослых. Однако в конце 1970-х гг. Рэй Скофилд (R. Schofield) предположил, что «стволовость» на самом деле зависит от взаимодействия гемопоэтических стволовых клеток (клеток, которые дают начало другим клеткам крови) с микроокружением, в котором они находятся (Schofield, 1978). Хотя это долгое время отрицалось, важность этой «ниши» в настоящее время все более признается: гемопоэтические стволовые клетки не могут быть поняты вне их контекста, что может объяснить трудности с их получением, размножением и сохранением *in vitro*.

Наконец, новые технологии, позволяющие проследить зарождение клеток, еще больше поставили под сомнение наше понимание биологии СК, поскольку исследования показали, что не каждая отдельная гемопоэтическая СК (ГСК) является полипотентной (дискутируется в работе: Hass et al., 2021; Хасс и др., 2018), их компартмент, как и предполагалось, также иерархически гетерогенен (Гривцова, 2020). Кроме того, не гемопоэтические стволовые клетки, называемые мультипотентными предшественниками, могут поддерживать производство кроветворных клеток в течение длительного периода времени (Sun et al., 2014).

Это лишь некоторые из примеров, иллюстрирующих потенциальное разнообразие этих клеток. Накопление таких противоречивых фактов относительно СК привело к двум противоположным взглядам: СК может быть *либо дискретной популяцией клеток со стабильными свойствами, количество которых ограничено на протяжении жизни* (Чертков, Дризе, 1998), *либо состоянием клетки, свойством, которое приобретает в определенном контексте* (Клеверс, Уотт, 2018; Зипори, 2004). Эти вопросы остаются предметом дискуссий по настоящее время. Более того, в статье *On the origin of the term «stem cell»* в журнале *Cell Stem Cell* до сих пор также обсуждается вопрос о первоисточнике самого термина «стволовая клетка» (Ramalho-Santos, Willenbring, 2007).

## *Исторические аспекты. Происхождение термина «стволовая клетка», зарождение учения о стволовых клетках*

История термина «стволовая клетка» начинается с конца XIX в. Тогда этот термин возник в контексте двух основных вопросов эмбриологии: непрерывности зародышевой плазмы и происхождения кроветворной системы. Теодор Бовери (Boveri, 1887) и Валентин Хакер (Hacker, 1892) использовали термин «стволовая клетка» для описания клеток, призванных дать начало зародышевой линии. Параллельно Артур Паппенхайм (Pappenheim, 1896, 1907, 1908a, 1908b; Pappenheim, Ferrata, 1910), Александр Максимов (Maximow, 1908, 1909), Эрнст Нейман (Neumann, 1868) и др. использовали его для описания предполагаемого прародителя клеток системы крови.

Термин «стволовая клетка» появляется в научной литературе еще в 1868 г. в работах выдающегося немецкого биолога Эрнста Геккеля (Haeckel, 1868). Геккель, главный сторонник теории эволюции Дарвина, нарисовал ряд филогенетических деревьев, представляющих эволюцию организмов, имеющих общего предка, и назвал эти деревья Stammbaume (по-немецки – «фамильные деревья» или «стволовые деревья»). При этом Геккель использовал термин Stammzelle (по-немецки – «стволовая клетка») для описания одноклеточного организма-предка, из которого, как он предполагал,

произошли все многоклеточные организмы (Haeckel, 1868, 1874). В пересмотренном, 3-м издании своей «Антропогении» (Haeckel, 1877) Геккель совершил один из своих характерных скачков от эволюции (филогения) к эмбриологии (онтогенез) и предложил, чтобы оплодотворенная яйцеклетка также называлась стволовой клеткой. Таким образом, Геккель применил термин «стволовая клетка» в двух смыслах: *как одноклеточный предок всех многоклеточных организмов и как оплодотворенная яйцеклетка, которая дает начало всем клеткам организма.*

Вильсон (Wilson, 1896) еще в 1-м издании своей книги «Клетка в развитии и наследственности» предположил существование стволовых клеток, обеспечивающих поддержание сперматогенеза.

Использование термина «стволовая клетка», относящегося к отдельной клетке эмбриона, способной давать начало более специализированным клеткам, можно найти позже в этом столетии. Центральная дискуссия в эмбриологии конца XIX в. вращалась вокруг теории Августа Вейсмана о непрерывности зародышевой плазмы (Weismann, 1885). А. Вейсман предположил, что зародышевая плазма, которая передавалась от одного поколения к следующему, была разделена на ранних стадиях эмбрионального развития на специализированные клетки (зародышевые клетки), которые отличались от зрелых клеток остальной части тела (соматические клетки).

Вдохновленные теорией Вейсмана, Теодор Бовери и Валентин Хакер задались целью идентифицировать самые ранние зародышевые клетки в эмбрионах животных, которые, предположительно, будут нести зародышевую плазму. Т. Бовери проследил клеточные линии нематоды *Ascaris* и изобразил их в виде древовидных диаграмм, которые он, так же как и Геккель, назвал *Stammbaume* (Boveri, 1892a, 1892b). Тогда (Boveri, 1887, 1892a, 1892b) Теодор Бовери пришел к выводу, что эти ранние зародышевые клетки сохранили полный набор хроматина, чтобы передать неповрежденный генетический материал следующему поколению, в поддержку теории Вейсмана. В 1892 г. при исследовании цикла развития ракообразных циклопов В. Хакер идентифицировал большую клетку, которая стала интернализированной при гастрюляции (Hacker, 1892). Он наблюдал, как клетка, которую он также назвал стволовой клеткой, подверглась асимметричному делению клеток и что одна из дочерних клеток стволовой клетки дала начало мезодерме, в то время как другие дали начало зародышевым клеткам. В. Хакер описывает стволовые клетки как клетки, которые позже, в процессе развития, производят ооциты в гонаде (Там же). В этих ранних исследованиях термин «стволовая клетка» относился к тому, что мы сегодня называем зародышевой линией.

Четыре года спустя Эдмунд Б. Уилсон популяризировал термин «стволовая клетка» на английском языке, рассмотрев работу Хакера и Бовери в своей книге «Клетка в разви-

тии и наследовании» (Wilson, 1896). Еще в 1-м ее издании Уилсон предположил существование СК, обеспечивающих поддержание сперматогенеза.

Книга Э. Б. Уилсона стала настольной книгой целого поколения эмбриологов и генетиков начала века; учитывая широкую читательскую аудиторию и влияние книги Уилсона, ему обычно приписывают изобретение термина «стволовая клетка» (Майеншайн, 2003; Шостак, 2006). Но Э. Б. Уилсон использовал термин «стволовая клетка» только в отношении специализированной материнской клетки зародышевой линии, подобно Т. Бовери и В. Хакеру.

В то же время исследователи кроветворной системы все время задавались вопросом, существует ли общий предшественник различных типов клеток крови. Применение методов окрашивания Пола Эрлиха (Ehrlich, 1879) позволило выявить и описать различные линии лейкоцитов. Изучая строение клеток крови, исследователи разделились на два лагеря. Дуалисты не верили в существование стволовой клетки, общей для всех кроветворных линий, считая, что миелоидные и лимфоидные клетки получены из клеток-предшественников, находящихся в различных кроветворных тканях, костном мозге и лимфатических железах или селезенке соответственно. Напротив, согласно унитарной модели кроветворения, существовала клетка, которая представляла собой общего предка эритроцитов, гранулоцитов и лимфоцитов. Последователи унитарной теории были готовы ввести термин,

отражающий потенциал развития такой клетки.

Для описания общего предшественника кроветворной системы использовались различные термины. В 1868 г. было высказано предположение (Нейман, 1868), что большая часть кроветворения происходит в костном мозге. Однако лимфатическая система исторически была первой тканью, которой предписывали кроветворную активность (Мюллер, 1844). Поскольку именно лимфоциты, отличаясь от эритроцитов и гранулоцитов размером, цветом и зернистостью, напоминали незрелые клетки с активностью предшественников, то клетки, предложенные в качестве общих предшественников, описывались как поливалентные большие лимфоциты (Паппенгейм, 1908b), настоящие большие лимфоциты (Максимов, 1908), негранулярные недифференцированные лимфоциты (Шаков, 1908) или лимфоидоциты (Паппенгейм, 1908a). Другие используемые термины включали первичные блуждающие клетки (Саксер, 1896), гемато- или гемогоны (Моллиер, 1909; Паппенгейм, 1907), гемобласты (Паппенгейм, Феррата, 1910) и гемоцитобласты (Zoja, 1910). Среди первых, кто начал использовать термин «стволовая клетка» для общего предшественника клеток крови, были Александр Максимов (Maximow, 1908), Вера Данчаков (Dantschakoff, 1908), Эрнст Нейман (Neumann, 1912).

Однако именно ученому русского происхождения Александру Максиму приписывают (Fliedner, 1998; Лихтман, Уильямс, 2006) изобретение термина в 1909 г. (Максимов,

1909). Справедливости ради необходимо отметить, что термин «стволовая клетка» можно найти в более ранних публикациях в области кроветворения. При этом о роли русского ученого Александра Александровича Максимова в появлении терминологии «гемопоэтической СК» следует остановиться особо.

В 1903 г. был объявлен конкурс на замещение должности профессора кафедры гистологии и эмбриологии Императорской военно-медицинской академии. Конференция академии (ученый совет) избрала его руководителем кафедры. С этого момента на кафедре начинаются активные научные исследования в области гистогенеза крови и соединительной ткани. Доведя гистологическую технику до искусства, используя лишь метод изучения переходных форм, ему удалось проследить основные этапы гистогенеза соединительных тканей и крови у различных животных как в эмбриональном, так и в постнатальном периоде. Выводы, сделанные им, свидетельствовали в пользу того, что все клетки крови развиваются из одного предшественника, который имел вид лимфоцита. Впервые он сформулировал это положение в статье, опубликованной на немецком языке в 1909 г.: «Лимфоцит как общая стволовая клетка разнообразных элементов крови в эмбриональном развитии и постфетальной жизни млекопитающих». В этой работе проф. А. А. Максимов впервые в отечественной науке использовал термин «стволовая клетка». Следует заметить, что автор использо-

вал термин Stammzelle в своей пионерской работе на немецком языке (от der Stamm – ствол). Соответствующий глагол со значениями «порождать», «происходить», «иметь начало» хорошо известен в немецком и английском языках. Абсолютной заслугой А. А. Максимова является то, что он выдвинул положение о стволовых клетках во взрослом организме, в частности о стволовой клетке крови.

Еще в 1896 г. Паппенгейм использовал стволовую клетку для описания клетки-предшественника, способной давать начало как красным, так и белым кровяным клеткам (Паппенгейм, 1896). Из-за ограничений экспериментальных методов, доступных в то время, дебаты о существовании общей гемопоэтической СК продолжались в течение нескольких десятилетий, пока окончательные доказательства не были представлены работой Джеймса Тилля, Эрнеста Маккалоха в 1960-х гг. (Беккер и др., 1963; Тилль, Маккалох, 1961; Тилль и др., 1964).

Таким образом, вначале термин «стволовая клетка» был использован в конце XIX в. в контексте фундаментальных вопросов эмбриологии – непрерывности зародышевой плазмы и происхождения системы крови. Демонстрация существования гемопоэтических стволовых клеток (Там же) показала, что эти клетки являются стволовыми клетками-прототипами – клетками, способными к почти неограниченной пролиферации (самообновлению) и к образованию специализированных клеток (дифференцировке). Так зародилось

учение о стволовой клетке.

Интерес к столовым клеткам неслучаен. Их уникальные способности к самообновлению, самоподдержанию и дифференцировке (данные свойства в литературе иногда объединяют единым термином «стволовость») делают их притягательным объектом для многих отраслей и в первую очередь для недавно сформировавшегося направления – регенеративной медицины.

Кроме прикладного аспекта применения стволовых клеток, реализуемого лишь частично, несомненно значимо изучение биологии стволовых клеток для фундаментальной науки. Знания о механизмах самоподдержания и дифференцировки стволовых клеток важны для понимания основополагающих процессов как при норме (от эмбриогенеза до старения), так и в случае патологии (канцерогенез, ряд неопухолевых, но фатальных болезней).

### **Многообразие стволовых клеток**

Тканевые СК взрослых – малочисленная популяция, до недавнего времени труднодоступная для изучения, но благодаря вектору, заданному Александром Яковлевичем Фриденштейном, было начато исследование данной неоднозначной популяции стволовых клеток (Фриденштейн и др., 1970). Именно советский ученый-медик, гистолог, гематолог, иммунолог, чл.-корр. АМН СССР и РАМН А. Я. Фриденштейн впервые описал и экспериментально подтвердил

существование в костном мозге и лимфоидных органах стволовых стромальных клеток, получивших впоследствии международное название мезенхимальные стромальные (стволовые) клетки (МСК).

Мезенхимальные стволовые клетки являются пристальным объектом изучения в течение последних десятилетий. МССК присутствуют во всех органах и тканях. Как в экспериментальных, так и в клинических исследованиях установлен потенциальный терапевтический эффект МССК или их производных продуктов. Относительная простота их выделения, способность к клоногенному росту, дифференцировке в культуре и мультипотентность определяют их как один из ключевых объектов регенеративной медицины при различных клинических состояниях.

Количество исследований, посвященных им, в последнее десятилетие растет в геометрической прогрессии (Samsonraj et al., 2017). МССК участвуют в многих принципиально значимых процессах, таких как дифференцировка и пролиферация клеток, ангиогенез (васкулогенез), регуляция воспалительных процессов или контроль окислительного стресса (Vizoso et al., 2019). Многочисленные доклинические исследования МССК или их секретомных продуктов показали терапевтическое воздействие на ключевые патологические процессы, связанные с изменениями внутреннего гомеостаза (Lalu et al., 2016; McIntyre et al., 2016; He, 2018; Riecke et al., 2015; Galipeau, Sensebe, 2018). МССК облада-

ют независимой от реципиента иммунной функцией и могут оказывать антимикробный эффект (Alcaayaga-Miranda et al., 2017). Клинические исследования применения МССК I и II фаз подтвердили положительный профиль безопасности при различных показаниях, включая иммунологические, костные, сердечные или нейродегенеративные расстройства (Nery et al., 2013). Проведены даже клинические испытания III фазы в отношении купирования реакции «трансплантат против хозяина», лечения болезни Крона, инфаркта миокарда и цирроза печени (Samsonraj et al., 2017). Примечательным фактом в этом контексте является то, что никем не сообщалось о каких-либо серьезных осложнениях или о неблагоприятных эффектах после трансплантации МССК (Zhang, He, 2019).

Важным для клинического применения МССК стал 2018 г., когда Европейское медицинское агентство (ЕМА) впервые одобрило использование клеточного продукта на основании МСК. Клиническое исследование фазы III NCT01541579 показало статистически значимое улучшение при лечении сложных перианальных фистул у пациентов с болезнью Крона с применением МСК, полученных из жировой ткани (*darvadstrocel*, ранее *Cx601*) (Panes et al., 2016). В сентябре 2018 г. компания Mesoblast объявила о положительных результатах своего исследования III фазы (NCT02336230) применения аллогенных костномозговых МССК (*remes-temcel-l*) у детей с острой РТПХ, рефрак-

терной к стероидам.

Не исключено, что 2019 г. может стать началом терапевтической эры МССК (Hoogduijn, Lombardo, 2019): впервые была проведена МССК-терапия острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), связанного с COVID-19 (Golchin et al., 2020). Однако в контексте МССК и инфекций более обоснованным будет их применение для лечения последствий (легочные фиброзы, ишемии), и многие вопросы еще требуют решения, а именно отбор доноров, источник МСК, сбор клеток, условия культивирования, количество пассажей и количество вводимых МСК, а также хранение.

Также необходимо четко определить биомаркеры стратификации прогностической эффективности, дозировки и способ введения для каждого конкретного показания.

Серьезный барьер для клинического применения МССК – их функциональная неоднородность, которая зависит от происхождения МССК (первичной биологической ниши), от состояния доноров (возраст, заболевания или неизвестные факторы). Возможно, что на свойствах МСК, их окончательном фенотипе, а соответственно, на направлении дифференцировки отражаются и условия их культивирования (сигналы субстрата, внеклеточного матрикса, количество кислорода).

Пионерскими в этом направлении можно считать работы российских исследователей еще в 2000-х гг. (Цыб и др., 2004), продемонстрировавших возможность получе-

ния культуры МССК с высокой клоногенной активностью, способных к дифференцировке в кардиомиобласты. Был показан их регенеративный потенциал в отношении восстановления миокарда, поврежденного химиотерапевтическим воздействием у лабораторных животных. При этом репаративные процессы в наибольшей степени усиливались через 4 нед. от момента введения культуры МСК. Через 1 мес. от трансплантации полученных кардиобластов у реципиентов отмечалось снижение проявлений оксидативного стресса. Эти данные абсолютно однозначно показали, что терапевтический эффект введения несингенных МССК проявляется стимуляцией пролиферации как клеток сердечной мышцы, так и клеток стромы и приводит к восстановлению нормальной гистологической структуры миокарда. Пусковыми в каскаде последовательных регенеративных событий являются изменения, происходящие в периваскулярной зоне миокарда, что, возможно, обусловлено «трофическим воздействием» введенных МССК на резидентные стромальные клетки-предшественники реципиента; это приводит к улучшению микроциркуляции и усилению ангиогенеза. Данные подтверждают существование «трофического эффекта» МСК, т.е. влияние факторов, секретируемых МССК в процессе культивирования (секретом). Эти экспериментальные исследования были подтверждены в клинической практике и повторены в зарубежных многоцентровых исследованиях при ишемической кардиомиопатии (Hare et

al., 2012).

Достижение существенных клинических эффектов возможно только в случае создания «управляемых» (не изменяющих направление дифференцировки) гомогенных клеточных культур МСК. Принципиально важными фактами в выработке стратегии получения культуры МССК являются источник их выделения и выбор в пользу аутологичных или аллогенных клеток.

Наиболее изученными и охарактеризованными, по литературным данным, на настоящий момент являются МСК, полученные из костного мозга. В качестве известных источников МССК описаны жировая ткань (Aust et al., 2004), периферическая кровь (He et al., 2007; Smiler et al., 2008), легких, синовиальных жидкостей, периоданальных лигаментов, мышечной ткани (Griffiths et al., 2005; Tuli et al., 2003; Fan et al., 2009; Gay et al., 2007; Jackson et al., 2010).

Изучается потенциал МСК, полученных из плаценты, клеток пуповинной (плацентарной) крови и клеток пупочного канатика и дентальной пульпы (In't Anker et al., 2004; Miao et al., 2006; Corrao et al., 2013; Erices et al., 2000; Mareschi et al., 2001; Seo et al., 2004; Shi, Gronthos, 2003).

Изучение различных источников получения МССК продемонстрировало целый ряд отличий в их биологических свойствах, протеомном и транскриптомном профилях (Elahi et al., 2016; Kwon et al., 2016; Davies et al., 2017; Chen et al., 2015). Установлены различия в способности формирования

клеточных колоний, отличия в мембранном иммунофенотипе (т.н. сурфактоме), в мультилинейной дифференцировке и в паракринных функциях (Billing et al., 2016; Sakaguchi et al., 2005; Rider et al., 2007; Hass et al., 2011; Maleki et al., 2014).

Выявлены некоторые преимущества использования аллогенных МССК перед аутологичными, однако клинический эффект тех и других сопоставим (Trounson, McDonald, 2015; Monsarrat et al., 2016; Atoui, Chiu, 2012; Steinert et al., 2012; Hare et al., 2012).

Важно, что благодаря иммунологической толерантности аллогенные МССК рассматриваются как «универсальные донорские клетки», что определяет существенные преимущества их использования в клинической практике, в т.ч. у онкологических больных.

Экспериментальное изучение влияния МССК в модели сочетанной трансплантации МССК и гемопоэтических стволовых клеток показало эффективность восстановления кроветворения при использовании сублетальных доз циклофосфана (Pavlov et al., 2018; Павлов и др., 2018). На экспериментальных моделях показаны эффективность и безопасность применения МССК в отношении миодистрофий различного генеза (Agrba et al., 2018; Агрба и др., 2018; Гривцова и др., 2020).

В настоящее время продолжается углубленная работа по изучению возможности применения МССК при кардио-

токсичности у онкологических больных, серьезного побочного эффекта применения препаратов антрациклинового ряда, обуславливающего повышенный риск заболеваемости и смертности от сердечно-сосудистой патологии у онкологических больных. Современные фармакологические методы лечения кардиомиопатий различного генеза хотя и позволяют замедлять развитие дисфункций миокарда, но имеют ограниченную эффективность у пациентов с терминальной стадией болезни. Многие исследователи полагают, что единственным радикальным способом лечения этой патологии является трансплантация сердца (Dergilev et al., 2020; Дергилев и др., 2020). Достаточно серьезными препятствиями к трансплантации являются нехватка доноров и высокая стоимость операции. Наиболее изученным и привлекательным является применение МСК.

В экспериментальных исследованиях (Grivtsova et al., 2020) было показано, что у животных, получивших МССК до начала введения антрациклинов (доксорубин 5 мг + МССК до начала введения доксорубина), зафиксирована нормализация гистоархитектуры мышечной ткани и активация пролиферативной активности стромальных клеток, что свидетельствует о положительном влиянии превентивной трансплантации МССК человека на активацию репаративных процессов в миокарде при антрациклиновой кардиомиопатии. Для этого необходим собственный клеточный биобанк как необходимая инфраструктура для разработки

и внедрения клеточной терапии на основе мезенхимальных стволовых клеток в комплексном лечении антрациклиновой кардиотоксичности. (Обзор литературы и данные: Там же.)

По данным многих исследователей, именно сочетание кардиомиобластов и недифференцированных МССК дает наибольший регенеративный эффект (Shudo et al., 2014; Zuppinger et al., 2000; Yoshida et al., 2018).

Получены положительные результаты системных трансплантаций кардиомиобластов и недифференцированных аутологичных и аллогенных МССК костномозговых МССК при проведении комплексной терапии поздних лучевых поражений сердца, развившихся у 16 пациенток после дистанционной лучевой терапии по поводу лимфомы Ходжкина (ЛХ) или рака молочной железы (РМЖ). В результате установлено, что клеточная терапия значительно улучшала эффективность лекарственного лечения, которое ранее было единственным способом терапии лучевых поражений жизненно важных органов. Клинический эффект такой комплексной терапии уже в первый год наблюдения за пациентками проявлялся в уменьшении степени выраженности сердечной недостаточности и улучшении качества жизни больных при отсутствии прогрессирования основного заболевания (лимфома Ходжкина и рак молочной железы) (Kursova et al., 2017; Курсова и др., 2017).

Продемонстрированы возможность, безопасность и эффективность применения костномозговых МССК при яз-

венном колите и болезни Крона. Установлено, что комбинированная клеточная и антицитокиновая терапия болезни Крона с перианальными поражениями достоверно способствует более частому и длительному закрытию простых свищей по сравнению с антибиотиками (иммуносупрессорами) (Knyazev et al., 2016; Князев и др., 2016; Knyazev et al., 2017; Князев и др., 2017). Также показано, что трансплантация МССК способствует поддержанию более длительной клинической ремиссии у больных с люминальной формой болезни Крона по сравнению с группой больных, страдающих язвенным колитом (Knyazev et al., 2017; Князев и др., 2017; Knyazev et al., 2016; Князев и др., 2016).

Идентификация инициальных МССК чрезвычайно затруднена в силу их малочисленности в тканях, один из возможных путей решения проблемы – применение различных видов клеточной селекции на основании мембранного иммунофенотипа клеток. Использование мембранных антигенов в качестве таргета отбора определяет возможность получения достаточно гомогенной клеточной культуры.

К настоящему моменту установлено, что большинство МССК клеточной культуры экспрессируют эндогликан (CD105), Thy-1 антиген (CD90) и CD73. Данные маркеры признаны Международным обществом клеточной терапии в качестве основных антигенов для идентификации большинства типов МСК. Однако и это не может считаться окончательной рекомендацией ввиду не абсолютной их специ-

фичности в отношении наиболее ранних популяций МСК; экспрессия данных антигенов присутствует на кроветворных (CD105) и эндотелиальных клетках различных этапов дифференцировки (CD90, CD105, CD73).

Типичным для МССК считается отсутствие экспрессии на мембране общелейкоцитарного антигена CD45, маркера стволовых клеток CD34, антигена, специфичного для В-клеток CD19, маркеров, ассоциированных с клетками миеломоноцитарной природы CD14, CD11b, а также антигена главного комплекса гистосовместимости II класса (HLA-DR).

Таким образом, с практической точки зрения возможность терапевтического использования МССК достаточно широка. Мультипотентный потенциал МССК является многообещающим в отношении использования для восстановления трофики тканей и органов даже у кардинально пролеченных онкологических больных на фоне проведения системной комплексной химиолучевой терапии, в частности при кардиомиопатиях и при лучевых повреждениях.

Особое место в лечении неврологических заболеваний занимают нейральные стволовые клетки (НСК) и нейропрогениторные клетки. В определенных специализированных участках головного мозга млекопитающих, в частности в гиппокампе, эпидермальной области или вентрикулярной либо субвентрикулярной зоне, осуществляется выработка пролиферирующих нейральных ПК (НПК). Нейрогенез, происходящий во взрослом мозге, был идентифици-

рован во многих организмах, начиная от грызунов и заканчивая приматами и людьми. Нейральные ПК обладают способностью к пролиферации и могут дифференцироваться в специфические типы нейронов и нейроглии, что делает их пригодными для привлечения в сферу регенеративной медицины. Нейральные ПК располагаются преимущественно в субвентрикулярной зоне взрослого человеческого мозга, что указывает на то, что головной мозг млекопитающего может производить самоисцеление через механизм рекрутинга эндогенных НПК в случае повреждения или дегенерации. В пределах нервной системы астроциты проявляют значительную гетерогенность (неоднородность), и некоторые классы астроцитов были продемонстрированы как еще один источник НПК (Брюховецкий, Хотимченко, 2019). Помимо существенной вариабельности, которая может наблюдаться в линиях НПК по причине недостатка стандартизации, в соответствии с организмами, в которые трансплантируется этот вид клеток (НПК), различные линии НПК могут проявлять себя разнонаправленным и отличным образом, что помогает объяснить, почему миграция не всегда происходит.

Последние годы определенное место в экспериментальных и клинических исследованиях лечения нервных болезней стали занимать НПК, происходящие из индуцированных полипотентных СК или при помощи трансдифференциации. Нейральные СК и ПК, наделенные аутологичными

свойствами, могут быть также получены с помощью стратегий по извлечению индуцированных полипотентных СК или методов трансдифференциации из соматических клеток, например фибробластов, в результате чего возможно избежание этических проблем, связанных с разрушением эмбрионов. Ученым удалось успешно произвести индуцированные полипотентные СК, или НСК, из разнообразных организмов, в т.ч. людей, а индуцированные полипотентные СК, или индуцированные НПК, переносящие информацию о заболевании, также были добыты из фибробластов пациентов. Нейральные ПК, полученные от доноров с патологиями, могут способствовать и ускорять скрининг лекарственных веществ и персонализированной медицины. Кроме того, данные категории НПК не связаны с проблемой отторжения трансплантируемого материала, хотя для клинической осуществимости подобных трансплантаций необходимо преодоление других крупных препятствий, имеющих отношение к безопасности и эффективности.

Особое место в типологии СК занимают клетки, добываемые при помощи методов партеногенеза, ядерного перемещения (трансфера) соматических и измененных соматических клеток, которые схожи по строению с эмбриональными стволовыми клетками (ЭСК). Ограничения, встречающиеся при использовании в клеточной терапии ЭСК человека, подтолкнули ученых к разработкам других пригодных источников клеток, с применением при этом тех же са-

мых подходов, что и при выработке ЭСК человека. Благодаря достижениям в области репродуктивной биологии методы партеногенеза и ядерного переноса (трансфера) клеток применяются для разработок новейших типов СК, в частности партеногенетических СК или линий ядерного переноса ЭСК. Прибегая к подобным стратегиям, можно конструировать линии мультипотентных СК, напоминающих по своему строению ЭСК. Деривативные производные ядерно перемещенных ЭСК теоретически могут с иммунологической точки зрения соответствовать ядерному донору. Тем не менее, несмотря на запрет данного технического приема, перед применением подобных типов СК по-прежнему возникает этический вопрос, связанный с возможностью продуцирования поддающегося имплантации эмбриона, способного к полноценному развитию. В этой связи метод измененного ядерного переноса (трансфера) смог эволюционировать в более приемлемую альтернативу клонированию, поскольку клетки генетически создаются таким образом, чтобы они могли генерировать дефектные трофобласты и тем самым препятствовать и сдерживать имплантацию эмбрионов.

В целях излечения неврологических болезней при помощи нейральных клеток, происходящих из ЭСК человека, было проведено большое количество доклинических исследований, продемонстрировавших эффективность на животных моделях, варьирующихся от грызунов до приматов. Типы клеток, применяемые в данных работах, включали НПК

и терминальные дифференцированные нейральные клетки. Как говорилось выше, МССК также обладают свойствами, которые позволяют им дифференцироваться в клетки, схожие по строению с нейральными клетками, поэтому они играли позитивную роль в улучшении функционирования, будучи трансплантированными в животные модели неврологических заболеваний (Брюховецкий А.С., 2003; Брюховецкий, Хотимченко, 2019).

Нейральные стволовые клетки (НСК), происходящие из других типов полипотентных СК, также подтвердили свою функциональность в доклинических работах. Например, глиально-обогащенные НПК, происходящие из человеческих индуцированных полипотентных СК, были трансплантированы в модели грызунов с боковым амиотрофическим склерозом, опосредованным мутантной супероксиддисмутазой-1. Эти пересаженные клетки затем смогли преобразоваться в астроциты и увеличить жизненный цикл мышей-реципиентов, что указывает на эффективность НСК и глиальных прогениторов, происходящих из индуцированных полипотентных СК человека, при клеточной терапии бокового амиотрофического склероза (Брюховецкий А. С., 2020).

В животных моделях повреждения спинного мозга рестриктированные глиальные клетки-предшественники человека и астроциты на их основе были способны выживать при пересадке в область травмированного спинного моз-

га, мигрировать в роstralном и каудальном направлениях в область примыкающего белого вещества. При этом данные клетки экспрессировали целый ряд фенотипических маркеров, в т. ч. GFAP (Брюховецкий А. С., 2019). Таким образом, применения одних лишь эмбриональных астроцитов недостаточно для стимулирования функционального восстановления через механизм аксональной регенерации на длительных расстояниях, что предполагает необходимость комбинирования клеточной трансплантации и иных терапевтических интервенционных мер, таких как использование нейротрофинов, сAMP, хондроитиназы. Тем не менее, принимая во внимание значительную неоднородность глии, следует заметить, что не все виды астроглии функционируют одинаковым образом при терапии неврологических расстройств. Как  $Olig2^+$  клетки-предшественники, извлекаемые из ЭСК человека, так и  $Olig2^-$  соответственно, могут быть дифференцированы в астроглиальные клетки. Однако при пересадке в крысиную модель ишемического инсульта астроглия  $Olig2^+$  выявляла некоторые отличия от  $Olig2^-$  и смешанных популяций астроглии и приводила к значительному прогрессу функции обучения и памяти крыс с ишемическим инсультом, что свидетельствует о функциональной гетерогенности клеток-предшественников глии.

Однако наиболее изученными, в силу более широкой возможности клинического применения, являются гемопоэти-

ческие стволовые клетки (ГСК), которые дают начало всем кроветворным росткам (эритроидным, гранулоцитарным, мегакариоцитарным, лимфоидным, моноцитарным) и поддерживают гемопоэз в стабильном состоянии на протяжении всей жизни человека. Характерными чертами этих клеток, как и всех СК, являются способность к самоподдержанию, пролиферации и дифференцировке (Чертков и др., 1998; Kondo, 1997). Именно пониманию, что такое ГСК, будет посвящена следующая глава этой книги, а все последующие главы монографии покажут их роль в организме и терапевтический потенциал этих удивительных клеток.

## **Глава 2. Что такое гемопоэтическая стволовая клетка? (соавт. д.б.н., к.м. н. Л.Ю. Гривцова)**

Гемопоэтическая стволовая клетка (ГСК), или другое ее название – кроветворная стволовая клетка (КСК), – это клетка-родоначальница всей многомиллиардной системы клеток кроветворения (гемопоэза), всех клеток иммунной системы (иммунопоэза) и главный регуляторный, управляющий и са-ногенетический инструмент среди всех 256 типов соматических и стволовых клеток в организме человека.

В предыдущей главе мы уже обсуждали тот факт, что ГСК впервые были описаны русским эмигрантом в США проф. А. А. Максимовым в 1908 г. как клетки-родоначальницы кроветворения. А. А. Максимовым было показано, что именно ГСК – это клетки, формирующие гемопоэз, т.е. клетки, лежащие в основе всего процесса кроветворения человека и животных. Но как мощное терапевтическое средство они не получили своего заслуженного признания в нач. XX в. Более полувека они были забыты и только в сер. 60-х гг. прошлого века ГСК были успешно применены для лечения острых и хронических лейкозов, лимфолейкозов и миело-

лейкозов у взрослых и детей путем проведения трансплантации костного мозга (Менткевич, Маякова, 2010). Невероятные успехи в лечении рака крови и даже полное излечение больных от этого онкологического недуга обусловили широкое, но преимущественно одностороннее, с целью поддержки травмированного гемопоэза, применение ГСК в лечении заболеваний человека. Позже, к концу XX в., ГСК в большинстве современных исследований широко применялись для восстановительного лечения нарушенного гемопоэза у онкологических пациентов после высокодозной химиотерапии опухолей. ГСК использовались как фундаментальная основа трансплантаций костного мозга в лечении неопластических образований, но прямого противоопухолевого эффекта ГСК на раковые клетки доказано не было (Брюховецкий А. С., 2011).

ГСК с маркерами клеточной поверхности  $CD34^+$ ,  $CD45^+$ ,  $HLA-DR^-$ ,  $CD38^-$  в организме человека являются самыми универсальными регуляторами гомеостаза, т.к. имеют самый большой период жизненного клеточного цикла (ок. 360 дней) (Пальцев и др., 2009). В свете современных концепций системного подхода к управлению очевидно, что в любом биомолекулярном процессе в организме человека и животных управляющей системой является самая медленная фаза (Неймарк, 1985). С учетом данного факта логично предположить, что  $CD34^+$ ,  $CD45^+$ ,  $HLA-DR^-$ ,  $CD38^-$

ГСК обладают доминирующими управляющими свойствами среди всех клеточных систем организма и их регуляторные функции являются системообразующими (Брюховецкий А. С., 2010) для всех нормальных клеток организма человека. Также наиболее ранние ГСК, возможно, под влиянием чрезвычайных стимулов способны трансформироваться как в НСК, так и в МСК, что с позиций теории клеточного замещения является крайне важным для реставрации поврежденных тканей.

Функцию обновления и восстановления тканей *in vivo* выполняют преимущественно тканеспецифические СК, которые представляют собой пул запасных недифференцированных предшественников клеток различных типов (Тепляшин, 2005). Выделены и иммунофенотипически охарактеризованы различные типы тканеспецифических СК взрослого организма – гемопоэтические ( $CD34^+$ ,  $CD45^+$ ) СК (ГСК) (предшественники всех клеток крови), нейрональные ( $CD133^+$ ,  $CD133^-$ ) СК (предшественники клеток нервной ткани) (НСК), мезенхимальные стромальные ( $CD10^+$ ,  $CD13^+$ ,  $CD44^+$ ,  $CD90^+$  (Thy-1),  $CD105^+$ ,  $CD34^-$ ,  $CD45^-$  и  $CD117^-$ ) СК (МССК – клетки, способные дифференцироваться в клетки тканей мезенхимального происхождения), а также СК других зародышевых листков.

Самым первым и самым эффективным опытом терапии с использованием СК, позволившим полностью излечить па-

циентов от рака крови еще в 60-х гг. прошлого века, был опыт применения препарата ГСК при гемобластозах. Путем трансплантации ГСК, полученных из костного мозга донора, удалось заместить все клетки кроветворения (гемопоэза) реципиента и полностью вылечить больного, страдающего острым миелолейкозом (Blood Stem Cell Transplantation, 1998). Сегодня стало очевидно, что ГСК, кроме формирования и восстановления кроветворения, имеют важнейшую регуляторную и системообразующую функцию в организме. В связи с этим считается, что применение биомедицинских клеточных продуктов (БМКП), изготовленных на основе ГСК, является наиболее перспективным направлением в современной медицине (Тупицын и др., 2014; отчет DARPA за 2011). Уже более 100 тыс. пациентов по всему миру получили лицензированный американский препарат «Гемакорд», содержащий ГСК пуповинной крови.

Взрослые ГСК  $CD34^+$ ,  $CD45^+$ ,  $HLA-DR^-$ ,  $CD38^-$  обладают уникальной способностью направленного трансфера в зону повреждения тканей органа, мигрируя на градиент концентрации воспаления (патотропизм, или хоуминг, ГСК) (Брюховецкий А. С., 2013; Баклаушев, 2015). ГСК, попадая в головной и спинной мозг, являются мощными индукторами синапсогенеза в нервной ткани или участвуют в формировании новых межклеточных контактов в тканях солидных органов (Брюховецкий А. С., 2010, 2013).

Известно, что при пересадке ГСК в различные органы

(почки, мозг, печень и т.д.) не наблюдается их прямой дифференцировки в специализированные клетки (кардиомиоциты, миоциты или клетки кожи) этих органов; так трансплантация клеток-предшественников гемопоэза в сердце не приводила к формированию миоцитов. Или их пересадка в слизистую кишечника не восстанавливала секреторную функцию органа. Локальная дифференцировка *in situ*, как правило, контролировалась «сигналами» микроокружения. Хорошо известна потенциальная возможность трансдифференцировки ГСК в НСК *in vitro* под воздействием определенных т.н. пертурбаторов (ретиноевая кислота) (Kuroda et al., 2010). Многолетние клинические наблюдения также подтвердили отсутствие аномалий дифференцировки СК в трансплантате. В то же время ГСК обладают функцией целенаправленной миграции к зонам повреждения (Чехонин и др., 2005; Баклаушев и др., 2014). В 2003 г. J. Praise в Англии запатентовал технологию трансплантации ГСК для интрацеребрального введения при лечении поврежденного мозга, которая также рекомендована авторами для использования в терапии болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и болезни Крейтцфельдта – Якоба. Аналогичные свойства целенаправленной миграции к повреждению, хоумингу, патотропизму характерны и другим тканеспецифическим СК и их предшественникам, таким как МССК и НСК (Kaplan, 2006; Snyder et al., 2006).

В настоящее время доказано, что трансплантирован-

ные клетки лейкоконцентрата мобилизованных мононуклеаров *формировали кластеры ГСК и гемопоэтических клеток-предшественников (ГПК) в ткани поврежденного органа* (Ono et al., 1999). В нашей работе было показано, что мультиклеточный кластер мобилизованных МНК, ГСК и ГКП человека после введения в организм (кровь, ликвор, ткань органа) крысы вел себя как системообразующий по отношению к входящим в него клеткам, и они организованно мигрировали преимущественно (78%) в пострадавший орган, а затем и в зону максимального повреждения и равномерно распределялись в этой зоне (Брюховецкий А. С., 2013). E. Snyder (2005) описал подобный эффект миграции НСК при введении в ткань мозга из правого (интактного) полушария в левое полушарие, где была смоделирована глиальная опухоль мозга мыши за 36 дней. В нашем исследовании повторение данного эксперимента на крысах с глиомой С6 введение лейкоконцентрата мобилизованных мононуклеаров, содержащих ГСК и МСК, занимало 14 дней. Этот феномен может быть ключевым не только в решении вопроса регенерации органов и тканей после повреждения, но и в разработке и создании клеточных препаратов на основе ГСК. Именно клеточный кластер трансплантированных кроветворных клеток имеет важнейшее значение для трансфера этих клеток к месту повреждения, а также целенаправленного распределения их в зоне повреждения патологического органа и адгезии СК к пострадавшим клет-

кам, оказанию оптимального саногенетического регуляторного и реставрационного воздействия СК и их предшественников на поврежденные клетки.

По-видимому, роль клеток микроокружения ГСК в восстановлении нарушенного гемопоэза является определяющей для уровня функциональной активности ГСК как в нише костного мозга, так и для ГСК, трансплантируемых в кровь или ткань, а также переливаемых в ликвор в составе кластера костномозговых клеток. Возможно, что для того чтобы получить требуемый функциональный (регуляторный, противоопухолевый, нейрореставрационный и т.д.) эффект ГСК в организме человека, целесообразно использовать их именно в составе лейкоконцентрата, содержащего весь спектр клеток микроокружения костномозговой ниши. Интересно, что изолированное введение клеток лейкоконцентрата мононуклеаров (МНК), освобожденных от ГСК ( $CD34^+$ ,  $CD45^+$ ,  $CD45^-$ ), не обеспечивает требуемых нейрореставрационных эффектов в эксперименте у крыс (Брюховецкий А. С. и др., 2015), как и изолированное введение очищенных ГСК не дает нужных эффектов нейрорегенерации (Брюховецкий, Хотимченко, 2018).

Как было отмечено выше, мобилизованные МНК костного мозга являются важной частью костномозговой ниши, в которой располагаются ГСК и МСК, и клетки микроокружения даже в периферической крови сопровождают ГСК и имеют важнейшее значение в поддержании активности

и функциональности различных типов стволовых клеток. По-видимому, клетки естественного микроокружения обеспечивают активность и системную функциональность ГСК и МСК. В этом ключе ГСК и МССК целесообразно использовать совместно с клетками их ближайшего микроокружения (Брюховецкий А. С., 2013).

ГСК, имплантированные в полушарие, противоположное опухолевому или другому патологическому (воспалительному, ишемическому, кровоизлиянию и т.д.) очагу, так же как и введенные внутривенно, демонстрируют общее свойство ГСК – целенаправленно мигрировать к очагу патологии и восстанавливать нарушенный внутритканевой гомеостаз (Брюховецкий А. С., 2011; Брюховецкий И. С. и др., 2015; Брюховецкий, Хотимченко, 2018). Данное свойство ГСК используется для суперселективной доставки иммунолипосомальных конструкций, содержащих противоопухолевые химиопрепараты или другие молекулы цитотоксического или цитостатического действия. Кроме того, возможна суперселективная доставка рентгеноконтрастных веществ, радиоизотопных препаратов, сигнальных белков и наноконструкций, повышающих чувствительность опухолевых клеток к традиционным способам терапии (Брюховецкий А. С., 2011). Перспективной представляется стратегия использования ГСК как транспортной системы адресной доставки биологической информации для локальной модуляции процессов апоптоза, что требует продолжения исследований в дан-

ном направлении (Брюховецкий И. С. и др., 2014, 2016). Подобные свойства СК, характерные для гемопоэтических стволовых клеток, описаны и для МССК (Caplan, 2013, 2014; Choop et al., 2015, 2016).

Начиная с последнего триместра внутриутробного развития на протяжении всей жизни человека основным гемопоэтическим органом является костный мозг – именно там сосредоточено абсолютное большинство стволовых кроветворных клеток (СКК). Содержание стволовых клеток в костном мозге у здоровых индивидуумов колеблется в пределах 0,5—4,0% среди мононуклеаров (Andrews et al., 1986; Civin et al., 1984). И этот небольшой пул стволовых кроветворных клеток обеспечивает человеку ежедневную потребность в 400 млрд клеток крови.

Концентрация стволовых клеток в периферической крови в состоянии стабильного кроветворения (у практически здорового человека) мала – менее 0,01%, а истинно стволовые клетки еще более редкая популяция – 1:100 000 (Чертков, Дризе, 1998), что делает затруднительным изучение их свойств и особенностей поведения даже самыми чувствительными методами.

Именно поэтому на ранних этапах изучения ГСК основным источником их получения был костный мозг, т.к. долго считалось, что клетки-предшественники отсутствуют в периферической крови в нормальных условиях. Однако по мере совершенствования методик, позволяющих обнаружить

очень незначительные количества клеток-предшественников гемопоэза (КПГ), был установлен факт периодического поступления гемопоэтических предшественников в периферическое русло под влиянием ряда факторов (Elias et al., 1992; Sprangrud, 1994). И так появилась уникальная возможность мобилизации периферических стволовых клеток крови (ПСК) – повышения количества КПГ в периферической крови при стимуляции гемопоэза ростовыми клеточными факторами. В это же время была представлена и первая характеристика клеток класса гемопоэтических предшественников (Ogawa, 1993).

Открытие феномена мобилизации СКК сделало возможным использование стволовых клеток крови для восстановления кроветворения после введения высоких доз цитостатиков и открыло новую эру в лечении когорты пациентов, требующих значительной эскалации доз химиопрепаратов (Neguet, 2015).

Феномен мобилизации стволовых кроветворных клеток заключается в их способности покидать костный мозг и выходить в кровеносное русло под влиянием повреждающих воздействий (например, цитостатиков), цитокинов, ростовых или колониестимулирующих факторов (Link et al., 2000).

При мобилизации стволовые клетки крови сохраняют свои главные свойства – значительный пролиферативный потенциал и способность к дифференцировке в зрелые клет-

ки крови (Chitnantakul et al., 2012; Eaves et al., 2015; Mohle et al., 1999; Zanjani et al., 1999).

В процессе мобилизации концентрация СКК возрастает до уровней, достаточных для трансплантации. Детальное изучение мембранных маркеров этих клеток проводится иммунологическими методами, в частности проточной цитометрией, с использованием многопараметровой иммунофлуоресценции и идентификации СКК на основании экспрессии антигена CD34.

Постепенно методы мобилизации периферических стволовых клеток крови совершенствовались и была показана возможность сохранения жизнеспособных ГСК в жидком азоте.

До настоящего времени большинство трансплантаций кроветворной ткани – это аутологичные трансплантации мобилизованных периферических СКК, когда больному после введения сверхвысоких доз химиопрепаратов кроветворение восстанавливают его собственными стволовыми кроветворными клетками, заготовленными заранее в период ремиссии основного заболевания (Korbling et al., 2011).

При аутологичной трансплантации у онкологического больного всегда существует риск ретрансплантации болезни, т.е. пересадки вместе со здоровыми кроветворными клетками клеток опухоли, циркулирующих в крови. Избежать этого возможно при использовании в качестве поддержки кроветворения донорских стволовых клеток.

Кроме того, при трансплантации донорских стволовых клеток при соблюдении определенных условий развивается феномен «трансплантат против болезни», что делает процедуру не просто терапией поддержки, но самостоятельным лечением.

Трансплантационным материалом могут являться как периферическая кровь, так и костный мозг и пуповинная кровь. Преимущества какого-либо источника стволовых кроветворных клеток определяются условиями конкретного лечебного учреждения, поскольку у каждого метода имеются достоинства и недостатки (Azouna et al., 2011; Blume et al., 2000).

Таким образом, развилось целое направление терапии онкологических больных, позволяющее использовать сверхвысокие дозы химиопрепаратов в качестве консолидирующей терапии, а травмированный этими высокими дозами гемопоэз поддерживать мобилизованными стволовыми клетками крови.

При обобщении знаний, полученных в области изучения гемопоэтических предшественников и всех последующих клеточных типов, были разработаны подробные схемы гемопоэза, которые мы используем и по настоящее время. Не последнюю роль здесь также сыграли российские ученые, и в первую очередь это И. Л. Чертков – выдающийся экспериментальный гематолог, д.м.н., проф., главный научный сотрудник Гематологического научного центра РАМН. Иосиф

Львович внес большой вклад в изучение клональности кроветворения. Согласно теории Черткова, стволовые кроветворные клетки (СКК) обладают высоким, но не безграничным пролиферативным потенциалом; *они не бессмертны и не могут «самоподдерживаться»*. СКК закладываются только в эмбриогенезе и расходуются последовательно, образуя короткоживущие, локально расположенные, сменяющие друг друга клеточные клоны, аналогично тому, как это происходит в яичнике. Иосиф Львович изучал оба типа стволовых клеток – и мезенхимальные, и кроветворные. В своих работах он продемонстрировал, что *МССК являются родоначальниками кроветворного микроокружения* и отличаются от СКК по радиочувствительности.

Считается, что при внутривенной трансплантации костного мозга в виде клеточной взвеси МССК теряются – они неспособны проникнуть в микрообласты, где происходит их функционирование, даже в случае если костномозговая взвесь вводится внутрь кости. МССК способны к переносу кроветворного микроокружения только при трансплантации под кожу или капсулу почки без превращения костного мозга в одноклеточную взвесь. В работах Черткова впервые были получены физиологические характеристики МССК, им разработана принципиально отличная от общепринятого мнения теория клональной кинетики СКК. Полученные данные нашли подтверждение в мировой практике. Показано, что при внутривенной трансплантации костного мозга до-

норские МССК не выживают; выявлены клоны «здоровых» СКК у больных с опухолями лимфоидной и кроветворной системы. Данные о клональности кроветворения подтвердились в исследованиях печального опыта Чернобыльской аварии. С сер. 1970-х гг. И. Л. Чертков вместе с А. Я. Фриденштейном заложили фундамент для экспериментального изучения стволовых клеток костного мозга. В 1984 г. вышла в свет монография Иосифа Львовича «Гемопоэтическая стволовая клетка и ее микроокружение», на которой, подобно труду Е. Уилсона, было воспитано не одно поколение гематологов, и которая до сих пор остается ключевым руководством в онкогематологии. Иосиф Львович был одним из пионеров гибридной технологии; он основал первую компанию по производству моноклональных антител в СССР. Ряд диагностических препаратов на основе моноклональных антител для определения группы крови, созданных И. Л. Чертковым, широко используется и сейчас (Чертков, Воробьев, 1973; Чертков, Дризе, 1998; Mathe et al., 1972).

Постепенно схемы кроветворения уточнялись и дополнялись с учетом вновь получаемых знаний, однако принципиальная структура их не изменилась до сих пор. Создание структурной схемы гемопоза облегчило понимание процессов кроветворения как в норме, так и при патологии, и особенно в онкогематологии, что позволило оценивать уровень злокачественной трансформации клеток, соотнося их иммунофенотип с нормальным аналогом и повлияло на разработ-

ку принципиально новых схем лечения.

Как уже упомянуто выше, более 60 лет прошло с момента, когда впервые была высказана гипотеза о существовании единой родоначальной гемопоэтической клетки, до получения первых реальных доказательств ее существования. Тогда был разработан и применен в эксперименте метод клонирования кроветворных клеток в селезенке смертельно облученных мышей (Till, McCulloch, 1961). Установлена способность клеток-предшественников гемопоэза образовывать в организме или культуре колонии-клоны, возникающие из одной клонообразующей клетки (Metcalf, Moor, 1971).

Далее, благодаря развитию методов клонирования гемопоэтических клеток-предшественников не только *in vivo*, но и *in vitro*, стало возможным глубокое изучение клеток данного отдела гемопоэза, а также была показана неоднородность класса гемопоэтических предшественников. В 70-х гг. были охарактеризованы полипотентные КПП, способные к самоподдержанию, обеспечивающие стойкое, длительное восстановление гемопоэза. Данные клетки имели высокий потенциал пролиферации и были способны к дифференцировке по всем направлениям гемопоэза (McCulloch, 1970; Lajtha, 1975).

Длительное время полипотентные КПП отождествлялись с клетками, формирующими селезеночные колонии, т.н. колониеобразующими единицами селезенки КОЕ-С, но даль-

нейшие исследования показали, что КОЕ-С не являются истинными ГСК, а представляют собой промежуточную фракцию клеток, относящихся к наиболее ранним предшественникам, вступившим на путь дифференцировки. Данная популяция неоднородна и содержит КОЕ-С8, образующие макроскопические колонии в селезенке спустя 8 дней после трансплантации гемопоэтической ткани и КОЕ-С12 с более высоким пролиферативным потенциалом, способные формировать дочерние колонии. Считается, что КОЕ-С12 содержат фракцию клеток, способных длительно поддерживать гемопоэз (Jones et al., 1990; Ploemacher, Brons, 1989).

В культуральных системах *in vitro* популяцию наиболее примитивных гемопоэтических клеток-предшественников на начальных этапах дифференцировки, а также ГСК в настоящее время отождествляют с клетками, иницирующими долгосрочную культуру клеток костного мозга (КИ-ДККМ) и культуру клеток с высоким потенциалом пролиферации (КОЕ-ВПП) (Bertoncello, 1992; Bredly, Hodson, 1979; Lerner, 1990).

Мышиные КОЕ-ВПП способны генерировать КОЕ-С12 и восстанавливать костный мозг летально облученных мышей (Moore, 1980). Аналогичная популяция выявлена в эмбриональной печени и пуповинной крови человека (Lu et al., 1993; Muench et al., 1994; Bender et al., 1991).

По мере дифференцировки КПП возрастает ее потенциал пролиферации, а способность к самоподдержанию снижает-

ся.

Клонирование гемопоэтических предшественников в краткосрочной культуре вязких сред с добавлением ростовых факторов дало возможность изучать коммитированные клетки-предшественники гемопоэза (КПГ) – клетки, имеющие определенную направленность дифференцировки (Colony assays of Haematopoietic cells, 1995). Считается, что клетка становится коммитированной, как только выходит из состояния покоя, хотя данное утверждение может оспариваться.

Были подробно описаны типы КПГ, вступивших на путь дифференцировки. В настоящее время в пуле коммитированных КПГ выделяют несколько популяций. На 14—18-й день после посева колонии в культуре образуется КОЕ-бласт – клоны из 40—1000 клеток без окончательной дифференцировки, с высокой способностью к самоподдержанию, которые при вторичных пересевах генерируют гетерогенные колонии из зрелых гемопоэтических клеток. Возможно, КОЕ-бласт – это переходная форма от ГСК к коммитированным КПГ (Leary, Ogawa, 1987; Rowley et al., 1987). КОЕ-бласт как клетки, иницирующие долгосрочные культуры, определяются рядом авторов как плюрипотентные.

Следующая в ряду дифференцировок – общий предшественник всех линий гемопоэза с высоким пролиферативным потенциалом – полипотентная КОЕ-ГЕММ (колониеобразующая единица гранулоцитов, эритроцитов, макрофа-

гов и мегакариоцитов). Клетки именно этого пула восполняют при необходимости все ростки гемопоэза. В культуре КОЕ-ГЕММ образует смешанные колонии, в их составе обнаруживаются гранулоциты, эритроидные клетки, мегакариоциты и макрофаги. Клетки данной субпопуляции способны восстанавливать и лимфоидное звено, что было доказано методами меченых генов в сочетании с клонированием клеток (Чертков, Дризе, 1998; Lemieux et al., 1995). КОЕ-ГЕММ очень гетерогенны по размеру и составу, потенциал пролиферации у большей части клеток данного пула чрезвычайно высок, а грань между КОЕ-ГЕММ и СГК несколько размыта; возможно, часть клеток, формирующих такие колонии, могут быть отнесены к разряду стволовых.

Бипотентные клетки-предшественники относятся к разряду коммитированных в отношении миелоидного ростка гемопоэза предшественников, способных дифференцироваться по 2 направлениям. К данному классу клеток-предшественников относят КОЕ-ГМ – колониеобразующие единицы гранулоцитов, макрофагов, а также БОЕ-Э/Мег – раннего общего предшественника эритроцитов и мегакариоцитов (Vol, Williams, 1980; Debile, Columbel, 1996; Ferrero, Broxmeyer, 1983). БОЕ-Э/Мег представлены эритробластами в окружении мегакариоцитов, а КОЕ-ГМ формируют гетерогенные лейкоцитарные колонии в культуре полужидких (вязких) сред на 12-й день от посева и состоят из 100—1000 клеток. (Debile, Columbel, 1996). С точки зрения ха-

рактеристики трансплантационного материала именно данный класс предшественников имеет наибольшее значение. КОЕ-ГМ определяет быстрое восстановление нейтрофильного звена, тогда как БОЕ-Э/Мег обеспечивают восполнение гемопоэза тромбоцитами и формируют красный росток.

Унипотентные клетки-предшественники: клоногенные предшественники гранулоцитов (КОЕ-Г), макрофагов (КОЕ-М) так же, как и КОЕ-ГМ, формируют колонии как минимум из 20—50 зрелых клеток (более 50 – критерий других лабораторий). При этом клеточные колонии гранулоцитов, содержащие меньшее число клеток, определены как кластеры, большие и малые (10—20 и 20—50 клеток соответственно). Кроме того, некоторыми исследователями принято, что гранулоцитарные колонии, содержащие более 500 клеток, соответствуют наиболее ранним гемопоэтическим предшественникам (в литературе встречаются термины «пре-КОЕ-Г» и «пре-КОЕ-ГМ»), подобным ранним эритроидным предшественникам (БОЕ-Э – бурстобразующие единицы эритроцитов) (Bender, van Epps, 1991; Cashman et al., 1983). БОЕ-Э формируются ранними эритроидными предшественниками на 18—20-й день от посева, могут быть малыми – включают 3—8 кластеров, средними – включают 9—16 кластеров, и большими – более 16 кластеров. Наиболее зрелые эритроидные предшественники – колониеформирующие единицы эритроцитов (КОЕ-Е) – образуют 1 или 2 кластера из 8—100 гемоглобинизирован-

ных эритробластов. Колонии такого типа формируются к 10—12-му дню с момента посева. Все клетки класса унипотентных обладают низкой способностью к самоподдержанию и высоким потенциалом пролиферации, обеспечивая быстрое, но кратковременное восстановление определенного (каждая единица – лишь одного) ростка гемопоэза. Материал с преобладанием гемопоэтических клеток-предшественников такого уровня дифференцировки наиболее успешно может быть применен в качестве гематологической поддержки при проведении полужестких химиотерапевтических режимов.

По мере накопления знаний в области изучения клоногенных предшественников были определены нормы количественного содержания различных колониеобразующих единиц при посеве 200 тыс. моноклеарных клеток костного мозга и 1 мл нормальной периферической крови (табл. 1).

**Таблица 1. Содержание колониеобразующих единиц в норме в периферической крови и костном мозге**

Тип колониеобразующих единиц	Периферическая кровь (1 мл)		Костный мозг (200 000 мононуклеарных клеток)	
	Среднее	Вариации	Среднее	Вариации
КОЕ-Э	67	15–310	19	1–270
БОЕ-Э	56	15–210	106	17–670
КОЕ-ГМ	62	19–200	39	4–380
КОЕ-ГЕММ	1	0,04–8	3	0,1–85

Данные, получаемые при оценке колониобразования клеток крови, включая КПГ, имеют большое значение с точки зрения качества гематологического материала, который будет применен с целью гематологической поддержки при высокодозной химиотерапии.

Длительное время оценка качества гемопоэтического материала при аутологичной трансплантации проводилась на основании определения роста колоний клеток в различных полужидких системах. Однако отсутствие единых стандартов данного теста из-за многообразия реактивов, а также временная отсрочка в получении результатов делали достаточно информативный метод колониобразования не совсем удобным для клинического применения.

И всегда возникал вопрос определения момента начала проведения сборов ПСК. Гематологические показатели

крови не всегда отражали реальный выброс клеток-предшественников в периферическое русло, и часто сборы требовали проведения более 3 повторных сеансов аферезов.

Данная проблема была решена с момента открытия антигена CD34<sup>+</sup> – основного маркера гемопоэтических клеток-предшественников (Civin, Strauss, 1984; Katz et al., 1985).

Внедрение в клиническую практику методов проточной цитометрии позволило оценить фенотип клеточной мембраны с помощью моноклональных антител к различным дифференцировочным антигенам. Стало возможным иммунофенотипически охарактеризовать все типы КПГ, включая СГК, и иммунологически различать клетки-предшественники различных классов по уровням коэкспрессии на CD34<sup>+</sup>-клетках других антигенов (Bender et al., 1991; Андреева и др., 2000).

Было установлено, что в норме популяция CD34<sup>+</sup>-клеток составляет 1—5% мононуклеарных клеток костного мозга и 0,01—0,1% клеток периферической крови, морфологически расцениваемых как бластные формы (Krause, Fackler, 1996; Sperling, Buchner, 1995). При этом уровни экспрессии CD34 могут быть как яркими (++) , что определяет СГК, так и средними (+) у коммитированных предшественников и слабыми (-/+) на последних стадиях дифференцировки КПГ.

В настоящее время используется несколько моноклональных антител (МКА) к молекуле CD34: My10, НРСА2, IСН3, IММ3, IСО115, QВЕND10 с различными спектрами чувствительности к данной молекуле и ее функциональным эпитопам. Показано, что наиболее качественными с точки зрения определения количеств циркулирующих КПГ являются МКА НРСА-2 с изотипом IgG-1 (Andrews et al., 1986; Loken, 1987; Siena et al., 1991).

Разработано несколько цитометрических протоколов для корректной оценки количества CD34<sup>+</sup>-клеток в кроветворной ткани, и наиболее распространенным является ISHAGE-протокол, однако в наших исследованиях показано, что применение этого метода может привести к некоторым погрешностям в количестве наиболее примитивных CD45<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup> стволовых кроветворных клеток. Изучение более 1 тыс. образцов мобилизованных стволовых кроветворных клеток крови и стволовых клеток костного мозга позволило нам разработать новый подход к оценке количества CD34<sup>+</sup>-клеток в любой кроветворной ткани на основании сочетания CD34 и нуклеотропных красителей семейства Syto (Гривцова, 2016).

Важным моментом изучения CD34<sup>+</sup>-клеток была демонстрация существования высокодостоверной корреляционной положительной взаимосвязи между числом CD34<sup>+</sup>-клеток в кроветворной ткани и количеством всех основных

классов колониеобразующих единиц (Андреева (Гривцова) и др., 2000).

Исследование коэкспрессии на  $CD34^+$ -клетках других дифференцировочных антигенов подтвердило установленную ранее высокую гетерогенность гемопоэтических стволовых клеток. В сочетании с оценкой роста колоний определение иммунологического фенотипа клеток-предшественников позволило наиболее полно охарактеризовать субпопуляции КПГ и их последовательность в ряду дифференцировок (Socinski et al., 1988), а также соотнести мембранный фенотип КПГ с функциональной активностью клеток (Андреева (Гривцова) и др., 2000; Андреева (Гривцова), 2000; Andreeva (Grivtsova) et al., 1999).

Так, общее число  $CD34^+$ -клеток складывается из КОЕ-ГЕММ, КОЕ-ГМ, КОЕ-Э, кластеробразующих клеток, а также стволовых, би- и унипотентных клеток-предшественников. В пределах  $CD34^+$  СКК существуют минорные субпопуляции непролиферирующих и недифференцирующихся клеток, а также наиболее ранние некоммутированные предшественники, обладающие значительным потенциалом к самоподдержанию.

По мере дифференцировки СКК от истинно стволовых до линейно рестриктированных унипотентных происходят изменения мембранного фенотипа клеток. Иммунологический фенотип  $CD34^+$ -клеток очень точно отражает стадию

зрелости стволовой клетки, или, точнее, клетки-предшественника. На основании экспрессии ряда антигенов на мембране CD34<sup>+</sup> можно судить о субпопуляционном составе СКК, т.е. о присутствии среди них полипотентных и линейно коммитированных клеток.

В настоящее время имеются достаточно четкие представления о соответствии между уровнем дифференцировки стволовой клетки или клетки-предшественника и иммунологическим фенотипом ее мембраны (Lanza et al., 2001; Seita et al., 2010).

Говоря об иммунологическом фенотипе клетки, мы подразумеваем под этим целый спектр антигенов и рецепторных молекул экспрессируемых, т.е. присутствующих на мембране и (или) в цитоплазме клетки.

Наиболее ранней стволовой, линейно не рестриктированной (не приобретшей черты какого-либо направления дифференцировки) соответствует клетка, экспрессирующая антиген CD34, но отрицательная в отношении экспрессии таких линейно неограниченных антигенов, как HLA-DR и CD38. Рядом исследований показано, что на клетке такого уровня может выявляться слабая экспрессия молекулы Thy-1, большинство из изотипов которой экспрессируются клетками негемопоэтической природы (D'Arena et al., 1998; Humeau et al., 1996; Mayani et al., 1994). Таким образом, истинной СКК может удовлетворять иммунофенотип CD34<sup>+</sup>CD90<sup>±</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>.

Стволовым кроветворным клеткам, только вступившим в цикл дифференцировок, инициирующим рост долгосрочных клеточных культур (КИ-ДККМ) и формирующим селезеночные колонии у мышей, с точки зрения иммунологического фенотипа могут соответствовать сразу несколько популяций. Экспрессия антигена CD34 на подобных клетках выражена (CD34<sup>++</sup>). Среди данных субпопуляций клеток выявляют СКК, отличающиеся по экспрессии антигенов CD38 и HLA-DR.

На части клеток выявляется молекула CD90, и целый ряд работ подтверждает возможность экспрессии панмиелоидных антигенов CD13, CD33. Однако большинство клеток пула КИ-ДККМ являются CD13<sup>-</sup>CD33<sup>-</sup> и, возможно, на данном этапе дифференцировки клетка выбирает путь между лимфоидным и миелоидным путями развития (Gaipa et al., 2002).

Неоднозначной является экспрессия клетками данного уровня дифференцировки молекулы трансферринового рецептора CD71. Классически принято относить данный антиген к клеткам-предшественникам эритроидного роста (van Dongen et al., 2012), но экспрессия данного антигена возможна на активно пролиферирующих кроветворных клетках ранних этапов дифференцировки.

Именно клетки пула КИ-ДККМ, наряду с истинно стволовыми СКК, способны длительно поддерживать травмированный гемопоэз.

Следующий этап дифференцировки – это уже коммитированные клетки-предшественники. Данному уровню соответствуют полипотентные СКК, формирующие крупные смешанные колонии гранулоцитов, макрофагов, мегакариоцитов, эритроцитов (КОЕ-ГЕММ), а также бурст-образующие клетки (БОЕ), полипотентные в отношении миеломоноцитарного и эритроидного (с его преобладанием) ростков. Клетки, формирующие колонии подобного рода, наряду с выраженной экспрессией стволовых клеток антигена CD34, позитивны в отношении линейно не ограниченных антигенов HLA-DR и CD38, кроме того, имеют четкие признаки миелоидной направленности дифференцировки (CD13<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>). Возможно существование субпопуляций, различающихся по уровням экспрессии панмиелоидных молекул. Часть клеток данного пула СКК приобретают черты мегакариоцитарной направленности дифференцировки (CD61<sup>+</sup>), а также демонстрируют возможность дифференцировки в направлении эритроидного ростка (CD71<sup>+</sup>CD236a<sup>+</sup>) (Hoffman et al., 1996; Krause et al., 1996; Akashi et al., 2000; Azouna et al., 2011; Babovic et al., 2014).

Завершают ряд коммитированных СКК бипотентные (КОЕ-ГМ) и унипотентные (КОЕ-М, КОЕ-Г) миелоидно-коммитированные клетки-предшественники, различающиеся по уровням экспрессии панмиелоидных антигенов CD13 и CD33. Естественно, существует и унипотентный лимфоид-

но коммитированный росток. Однако клетки данных субпопуляций практически не формируют краткосрочных колоний, и изучение СКК данного пула возможно только с применением иммунологических методов.

Именно пул линейно коммитированных (КОЕ-ГЕММ, КОЕ-ГМ, КОЕ-М, КОЕ-Г) клеток обеспечивает при трансплантации кроветворной ткани достаточно быстрое восстановление как лейкоцитов (в основном за счет нейтрофилов), так и тромбоцитов (популяция полипотентных КОЕ-ГЕММ).

С точки зрения фенотипических характеристик клеточной мембраны стволовым клеткам соответствует популяция  $CD34^{++}$ ,  $CD38^{-}$ ,  $HLA-DR^{-}$ ,  $CD45^{-/+}$  (Huang, 1994).

Поэтому изучение уровней коэкспрессии антигенов  $CD38$  и  $HLA-DR$  на  $CD34^{+}$ -клетках может представлять значительный интерес при характеристике как всего пула гемопоэтических предшественников, так и субпопуляций стволовых, наиболее примитивных гемопоэтических клеток ( $CD34^{++}$ ).

Конечно, была подробно изучена экспрессия ГСК и общелейкоцитарного антигена  $CD45$ , определяющего все клетки гемопоэтической природы. Показано, что все  $CD34^{+}$ -клетки экспрессируют как высокомолекулярные, так и низкомолекулярные изоформы  $CD45$ . При этом проявляются разные уровни коэкспрессии данной молекулы, что дает до-

полнительные возможности подробной характеристики субпопуляций КПК. Ожидаемо уровни экспрессии CD45-антигена в популяции CD34<sup>+</sup>-клеток оказались различными как у взрослых, так и у детей и варьировали в зависимости от дня сбора периферических стволовых кроветворных клеток (Андреева, Тупицын, 2002; Гривцова, 2009).

Несомненный интерес представляет оценка коэкспрессии на мембране ГСК трансферринового рецептора, антигена CD71. Экспрессия CD71 описана в ходе созревания эритроидных клеток. Данный антиген представлен на пролиферирующих клетках и на эритроидных предшественниках (БОЕ-Э/КОЕ-Э) (Olweus, 1998; Sieff et al., 1987).

Изучение коэкспрессии антигена CD71 на клетках костного мозга показало, что фракция CD34<sup>+</sup>, lin<sup>-</sup> (т.е. когда линейно направленные антигены не экспрессируются и клетки не дифференцированы) была высокообогаченной в отношении экспрессии CD71 (CD71<sup>++</sup>). Незначительное количество клеток, экспрессирующих какие-либо линейно направленные маркеры, имело коэкспрессию CD71 (в основном активированные Т- и В-клетки). Отмечено также, что большинство CD34<sup>++</sup>-клеток костного мозга были CD71<sup>++</sup> или CD71<sup>+</sup>, тогда как CD34<sup>+</sup>-клетки периферической крови были представлены популяцией CD34<sup>++</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD71<sup>+</sup>, что может подтверждать их более низкий потенциал пролиферации по отношению к клеткам костного мозга с фенотипом

CD34<sup>++</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD71<sup>++</sup>. Нами установлено существование субпопуляции стволовых кроветворных CD34<sup>+</sup>-клеток с фенотипом Thy-1<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>, которая предположительно и является наиболее ранней активно пролиферирующей популяцией, соответствующей КОЕ-ВПП (Андреева, Тупицын, 2005).

Изучению роли Thy-1 антигена (CD90) на CD34<sup>+</sup>-клетках также уделяется много внимания. Данная молекула вовлечена в регуляцию процессов пролиферации и опосредует отрицательный сигнал, приводящий к ингибированию пролиферации ранних КПГ. При использовании метода проточной цитометрии была установлена коэкспрессия CD90 и CD117 (с-Kit рецептора) на CD34<sup>+</sup>-клетках (D'Arena et al., 1998, 1996), что в дальнейшем подтверждено нашими исследованиями (Grivtsova, Tupitsin, 2016). Продемонстрировано присутствие популяции Cd34<sup>+</sup>Thy-1<sup>+</sup> стволовых клеток с коэкспрессией миеломоноцитарного антигена, CD33, экспрессия которого характерна только для клеток кроветворной природы (Андреева, Тупицын, 2005; Grivtsova, Tupitsin, 2016).

В последнее время показано, что ранние гемопоэтические клетки-предшественники экспрессируют антигены миелоидного роста – CD33 и CD13. Продемонстрирована экспрессия CD33 на КОЕ-ГЕММ, в дополнение к экспрессии на КОЕ-ГМ и КОЕ-Э; таким образом, CD33 является маркером КПГ, коммитированных в направлении миелоидного роста. Позднее было показано, что КОЕ-ВПП содер-

жат CD33<sup>+</sup>-клетки. Однако трансплантация гемопоэтического материала, истощенного в отношении CD33<sup>+</sup>-, CD34<sup>+</sup>-клеток, приводит к медленному, но стойкому восстановлению гемопоэза. Кроме того, CD33<sup>-</sup>-, CD34<sup>+</sup>-клетки содержат популяцию предшественников, способную к выраженной пролиферации в долговременных культурах клеток костного мозга (la Russa, Giffin, 1992; Olweus, 1998). Это подтверждает факт, что основная часть СГК является CD33-отрицательной.

Подобно CD33, CD13 является маркером начального миелопоэза, однако было обнаружено, что клетки-предшественники эмбриональной печени с фенотипом CD34<sup>++</sup>, CD38<sup>-</sup>, lin<sup>-</sup>, экспрессировали CD13. Кроме того, обнаружено, что магнитная селекция с применением антител к молекуле CD13 способствовала удалению значительной пропорции CD34<sup>++</sup>-, CD38<sup>-/+</sup>-клеток. Таким образом, подтверждается наличие рецепторов к данной молекуле на стволовых гемопоэтических клетках, но следует заметить, что экспрессия CD13 обнаружена на В- и Т-лимфоцитах. При характеристике особенностей субпопуляционного состава CD34<sup>+</sup>-клеток установлено, что CD13 появляется на достаточно ранних этапах, практически в самом начале дифференцировки клеток-предшественников, и уровни его сохраняются достаточно долго. Хотя, возможно, молекула CD33

и появляется на начальных этапах дифференцировки (пре-КОЕ-ГМ), но, вероятно, постепенно утрачивается по мере гранулоцитарной дифференцировки.

Кроме перечисленных антигенов ранних этапов дифференцировки, на клетках-предшественниках отмечена экспрессия целого ряда более поздних кластеров дифференцировки.

Описана также коэкспрессия на КПП линейно рестриктированных маркеров лимфоидного звена, как Т-клеток, так и В-клеток. В частности, описана небольшая фракция CD34<sup>+</sup>-клеток костного мозга, коэкспрессирующих CD7, причем данные клетки имели миелоидный дифференцировочный потенциал и в культуре *in vitro* формировали гранулоцитарно-макрофагальные колонии клеток (Cannabon et al., 1992). Популяция CD34<sup>+</sup>-, CD7<sup>+</sup>-клеток, способных образовывать как Т-клеточные, так и миелоэритроидные колонии, выделена также из тимуса человека (Kurtzberg, Waldman, 1989). Кроме того, обнаружено, что CD34<sup>+</sup>-, CD7<sup>+</sup>-популяция клеток из эмбриональной печени человека, дифференцирующихся в тимической культуре в Т-клетки, содержит также примитивные клетки-предшественники с характеристикой КОЕ-ВПП (Vargena, Muench, 1993). В ряде работ показано, что полипотентные клетки мышей экспрессируют CD4-антиген; выявлена популяция CD34<sup>+</sup>-клеток костного мозга человека, также коэкспрессирующая данный

антиген. Функциональные исследования *in vitro* выявили, что во фракции CD34<sup>+</sup>-, CD4<sup>-/+</sup>-клеток присутствовал целый ряд клоногенных предшественников: КОЕ-ГМ, КОЕ-Э, КОЕ-Мег, а также клетки, инициирующие долгосрочные клеточные культуры (Louache, Debili, 1994; Wineman, Gilmore, 1992).

В отношении В-клеточной лимфоидной рестрикции (Janossy et al., 1991) к сказанному выше следует добавить, что пропорции CD34<sup>+</sup>-клеток периферической крови и костного мозга, экспрессирующие В-клеточный антиген CD19 и общий (common) антиген CD10, в процентном отношении несколько различаются – содержание таких клеток в периферической крови ниже, чем среди КПГ костного мозга (Bender et al., 1991). Дополнительно нами установлен факт существования CD34<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>-клеток, не экспрессирующих пан-В-клеточный антиген CD19 (Grivtsova, Tupitsin, 2016). Данный факт подтверждает возможность мобилизации наиболее ранних субпопуляций стволовых кроветворных клеток.

Изучение субпопуляционного состава ГСК не только является фундаментальным аспектом, дающим более детальное представление о биологии стволовой клетки, но также очень важно с практической точки зрения. Не секрет, что у части больных мобилизация бывает неуспешной, а у части, даже в случае набора достаточной для восстановления

кроветворения дозы стволовых кроветворных клеток, оптимального восстановления одного или нескольких ростков не происходит. Одним из возможных объяснений являются особенности субпопуляционного состава  $CD34^+$ -клеток. При этом особенности субпопуляционного состава  $CD34^+$ -клеток крови могут определять эффективность мобилизации; особенно значимой в данном контексте оказалась субпопуляция  $CD34^+CD^{45\text{---}low}$  стволовых клеток крови (Андреева, Тупицын, 2015).

Нозологическая форма заболевания у онкологических пациентов также отразилась на субпопуляционном составе мобилизованных СКК (Гривцова, 2016). Кроме того, оказалось, что субпопуляционный состав СК отличается у онкологических больных взрослого возраста и детей, больных раком; также имеются различия в количестве отдельных субпопуляций у онкологических больных и здоровых доноров (Grivtsova, Tupitsin, 2016).

Исследования субпопуляционного состава мобилизованных ГСК значимы не только для онкологических больных; изучаются особенности пула стволовых клеток и при других фатальных заболеваниях, таких как боковой амиотрофический склероз (Tupitsyn et al., 2006). Показано, что мобилизованные СК ( $CD34^+$ ) больных позднего периода травматической болезни спинного мозга гетерогенны по экспрессии  $CD45$ ,  $CD38$ , мономорфных детерминант HLA-DR, эпито-

пов трансдучерной молекулы ИЛ-6 - *gp130* (*CD130*). У большинства пациентов обнаруживается фракция  $CD34^+$ -клеток, на которых отсутствует или представлен с низкой плотностью общелейкоцитарный антиген  $CD45$ . Пропорция наиболее примитивных ГСК ( $HLA-DR-CD38^-$ ) клеток лишь у 2 пациентов была  $> 15\%$  в пределах  $CD34^+$ -клеток. Интересным оказалось то, что экспрессия *gp130*-общей трансдучерной молекулы цитокинов семейства ИЛ-6 на  $CD34^+$ -клетках имела место во всех случаях, у 26% больных – в активированной форме (сочетание эпитопов C7 + A7).

Таким образом, особое значение, на наш взгляд, приобретает исследование субпопуляционного состава  $CD34^+$ -клеток. Полученные данные указывают на неоднородность состава циркулирующих в крови и трансплантируемых клеток-предшественников гемопоэза. Наличие антигенов  $CD13$  и  $CD33$  указывает на миелоидную направленность дифференцировки, а экспрессия  $CD7$  и  $CD2$ , часто в сочетании с B-линейными антигенами  $CD19$ ,  $CD20$ ,  $CD10$ , свидетельствует о лимфоидной коммитированности клеток-предшественников. Возможно, пропорция  $HLA-DR$ -негативных клеток в  $CD34$ -позитивном пуле отражает фракцию истинно стволовых клеток. Однако для подтверждения этого факта потребуются дополнительные опыты, целью которых явится экспериментальная проверка отсутствия миелоидно-коммитированных клеток с фенотипом  $HLA-DR^-$ . Важным под-

тверждением существования субпопуляций в пределах пула CD34<sup>+</sup>-клеток является наличие сильных ассоциативных связей между отдельными антигенами. Эти связи наиболее выражены между линейно не рестриктированными антигенами и некоторыми миелоидными маркерами, а также ранними Т- и В-линейными маркерами. Последнее, на наш взгляд, указывает на то, что коммитированность по лимфоидной линии, по-видимому, касается как Т-, так и В-лимфоцитопоэза и происходит синхронно, а не разобщенно. Накопление этих данных может помочь в решении вопросов полноты и стабильности гемопоэза на основе субпопуляционного состава стволовых клеток. К сожалению, приходится признать, что практическое решение этих вопросов пока нигде в мире не достигнуто. Препятствиями служат как сама процедура трансплантации, при которой больному вводится материал, собранный за несколько (обычно 2—3) лейкофезов, так и недостаточная иммунологическая оценка субпопуляционного состава трансплантируемого материала и показателей иммунитета в посттрансплантационном периоде.

Детальные сведения о мембранном иммунофенотипе стволовой клетки, а соответственно, и о субпопуляционном составе пула стволовых кроветворных клеток чрезвычайно важны как с клинических (прогноз скорости восстановления каждого конкретного кроветворного ростка), так и с фундаментальных (понимание особенностей дифференцировки нормальных клеток крови на ранних этапах кроветворения)

позиций.

С учетом полученных различий в субпопуляционном составе ГСК у онкологических больных разного возраста и здоровых доноров можно взглянуть на проблему более широко и обсуждать возможность присутствия у онкологических больных некоего травмированного пула ГСК.

Несмотря на то что трансплантация ГСК и трансплантация костного мозга осуществляется в России более 70 лет, специальных отечественных препаратов, содержащих ГСК, не существует, а трансплантации ГСК и подбор доноров костного мозга осуществляются только как «трансплантация костного мозга», на основе гистосовместимости и количества ГСК. Не существует и официальных клеточных препаратов для восстановления поврежденного гемопоэза после химиотерапии (ХТ) и лучевой терапии (ЛТ). При угнетении миелоидного ростка при ХТ или ЛТ (преимущественно при облучении плоских костей – грудины и таза) быстро (7—12 дней) или отсроченно (3—6 нед.) возникает нейтропения, опасная развитием инфекционных осложнений, грибковых поражений, повреждений кожи (мукозид, раны, трещины); присоединяются сопутствующий иммунодефицит и ЦМВ-инфекция. К лечению добавляют антибиотики для лечения внутритканевой инфекции и Г-КСФ (нейпоген, граноцид, нейпомакс, грановесил и т.д.). Тромбоцитопения опасна развитием геморрагического диатеза, поэтому применяется тромбоцитопенический концентрат. Поэтому во-

прос о новых клеточных продуктах, которые могут быть использованы для терапии осложнений и побочных эффектов ХТ и ЛТ опухолей, по-прежнему крайне актуален для современной отечественной и мировой онкологии. И перспективными здесь могут оказаться и стволовые кроветворные клетки в том числе.

Подводя итоги этой главы, следует сформулировать очень важные и концептуальные положения о функциональной и системообразующей роли ГСК в организме человека. Очевидно, что ГСК является не только основной кроветворной клеткой организма человека и прародительницей всех миллиардов клеток гемопоэза и иммунопоэза, но ГСК и ее прямые потомки, клетки-предшественники гемопоэза, являются основным системообразующим компонентом системы биоуправления и саногенеза органов и тканей, базовым элементом регуляции гомеостаза организма человека и причиной формирования большинства болезней цивилизации. Мы считаем, что именно ГСК принадлежит центральное место в возникновении и формировании основных болезней цивилизации человечества.

# **Глава 3. Состояние проблемы диагностики и лечения фатальных болезней цивилизации**

Фатальные, или, другими словами, смертельные, болезни цивилизации – это достаточно большая группа неизлечимых заболеваний населения мира, для которых не существует способов реальной ранней молекулярно-биологической диагностики и пока не создано эффективного лечения. К этой группе заболеваний относят большинство злокачественных онкологических заболеваний (все типы рака, гемобластозы, все типы лимфом, меланома, мультиформная глиобластома и т.д.), нейродегенеративные заболевания (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, болезнь Бинсвангера, мультисистемная корковая атрофия, мозжечковая атрофия, оливопонтocerebellарная дегенерация, боковой амиотрофический склероз и т.д.), аутоиммунные заболевания (рассеянный склероз, рассеянный энцефаломиелит, аутоиммунная миокардиопатия, системная красная волчанка, полимиозит, ревматоидный артрит, сахарный диабет I типа, аутоиммунный тиреоидит и т.д.). Как видите, это далеко не полный перечень самых тяжелых и неизлечимых болезней человечества. Несомненно, эти болезни не занимают первой строчки в ряду смертельных заболеваний че-

ловечества и уступают пальму первенства сердечно-сосудистым заболеваниям, но они стоят на втором и третьем местах по смертности населения в мире и на первом месте по степени инвалидизации населения и утрате трудоспособности.

Почему эти заболевания называют фатальными болезнями цивилизации? Как ни удивительно, это связано с тем, что этих болезней не существовало у древних людей, они появились только в последние 100—150 лет. Особенно наглядно это демонстрируют рак и другие злокачественные опухолевые новообразования. Этих заболеваний в принципе не существовало у древних людей, и они появились только в Средние века, когда стала формироваться цивилизация. Древние люди, жившие 2—3 тыс. лет назад, не болели раком. Michael Zimmerman, проф. Университета Манчестера (Manchester University), и его коллега Rosalie David (2015) обследовали сотни мумий в безуспешных попытках найти следы злокачественных опухолей у древних людей. В течение 10 лет они изучили сотни мумий Древнего Египта и Южной Америки возрастом ок. 3 тыс. лет и не нашли у них явных признаков опухолей. Лишь у одной египетской мумии вроде бы обнаружился рак толстой кишки. В литературных источниках, включая древнейшие письменные свидетельства, нет намеков на заболевание, которое спустя тысячелетия стало чуть ли не самой массовой причиной смертности населения. Парадоксальный вывод: рак – современное заболевание, которое спровоцировано загрязнением

окружающей среды и неправильным питанием (Zimmerman, David, 2017).

В настоящее время, несмотря значительные успехи в лечении рака, определенные формы рака (рак легких, рак печени и т.д.) и других злокачественных новообразований (некоторые гемобластозы, мультиформная глиобластома, меланома, миеломная болезнь, лимфома и др.) остаются неизлечимыми и фатальными. Нет лечения и возможности предотвращения быстрого летального исхода при диагностике бокового амиотрофического склероза (БАС), который современные неврологи называют еще болезнью моторного нейрона (БМН). Время жизни пациентов с установленными диагнозами некурабельного рака, ряда неизлечимых ЗНО и БАС составляет 1—3 года. До 5 лет и более с этими диагнозами доживают не более 10—15% больных. Диагностика этих фатальных заболеваний крайне затруднена и часто запаздывает, а установленный диагноз – это уже «приговор без права на помилование». Так, диагноз боковой амиотрофический склероз (БАС) устанавливают только клиническим и нейрофизиологическим способами, когда у пациента уже погибло более 70—80% мотонейронов и восстановление невозможно. Молекулярно-биологическая диагностика нейрофиламентов в ликворе больных с БАС также позволяет поставить диагноз только тогда, когда уже разрушены мотонейроны, а это всегда поздно и смертельно для пациента. Аналогичная ситуация и при других нейродегенеративных

заболеваниях, когда повреждение нейронов уже необратимо и помочь больному практически невозможно.

Если представить перед собой линейную плоскость, на которой расположились все существующие смертельные заболевания человека, то злокачественные опухоли расположатся на ней на одной стороне, а на противоположной стороне будут находиться нейродегенеративные заболевания и в первую очередь БАС. Это действительно две крайние точки в существующем континууме неизлечимых заболеваний организма человека и две крайние противоположности среди всех смертельных болезней человечества. БАС – это заболевание, которое сопровождается массивной нейродегенерацией передних рогов спинного мозга, гипотрофией и атрофией мышц туловища и конечностей, т.е. формированием синдромов «минус-ткань» в организме, а злокачественные новообразования сопровождаются пролиферацией, отеком ткани, разрастанием и миграцией клеток и формированием в организме синдрома «плюс-ткань». Поэтому мы предположили, что сравнительный анализ этих двух противоположных патологических феноменов абсолютно разных смертельных болезней может дать ключ к решению проблемы их ранней диагностики и диагностики других малокурабельных нейродегенеративных заболеваний нервной системы (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, оливопонтocerebellарная дегенерация, системные корковые и мозжечковые атрофии и т.д.), а также поможет понять,

какими способами лечения можно их вылечить или хотя бы остановить прогрессирующее заболевание.

Показано, что ранняя диагностика любого неизлечимого заболевания у человека дает ему определенный шанс на увеличение продолжительности жизни и последующего выживания в результате своевременно начатого лечения. В современной онкологии существует ранняя молекулярно-биологическая диагностика (МБД) рака и других ЗНО, которая основана на выявлении молекул онкоспецифических белков (ОСБ), или т.н. онкомаркеров, в биологических жидкостях пациента (кровь, моча, ликвор и т.д.). Онкомаркеры позволяют выявить у человека рак и ЗНО на I—II стадиях и после адекватного и своевременного лечения обеспечить ему 5-летнюю медиану выживаемости. Было продемонстрировано, что показатели выживаемости от рака увеличиваются в 2—3 раза именно при ранней диагностике ЗНО с использованием онкомаркеров в виде ОСБ. То есть, ранняя диагностика способствует повышению медианы 5-летней выживаемости раковых больных в 2—3 раза, а в ряде случаев и полному выздоровлению больных (Давыдов и др., 2017). Современные критерии ранней диагностики рака и ЗНО позволяют диагностировать канцерогенный процесс тогда, когда он уже получил определенную канцерогенную тканеспецифичность и тканевую «прописку», что зачастую бывает достаточно поздно, когда рак, при минимальном первичном очаге и высокой злокачественности, уже дал множественные от-

даленные метастазы. Обнаружение онкомаркеров позволяет заподозрить наличие опухоли в организме на относительно ранней стадии, проводить масштабные скрининговые исследования и отслеживать динамику болезни в процессе лечения. При выявлении в процессе скрининга повышенного уровня одного из онкомаркеров требуется проведение дополнительных методов исследования, без которых постановка диагноза неправомерна.

В настоящее время диагноз БАС (англ. Amyotrophic Lateral Sclerosis, или сокр. ALS) или БМН устанавливают только клинически и по данным электронейромиографии (ЭНМГ), когда больного спасти практически невозможно и у него осталось не более 10—15% мотонейронов в нервной ткани. Ранней МБД БАС и реального лечения при БАС нет. И если для ранней диагностики рака уже были найдены ранние онкомаркеры заболевания, то для БАС их просто не существует, и в этой связи прогноз при диагнозе БАС звучит более трагично, чем прогноз при диагностике рака или других ЗНО. Определенные формы рака имеют шансы на излечение, а вот ALS в современном его понимании – нет. Смерть при раке менее мучительна и сопровождается утратой сознания и комой на фоне раковой интоксикации, а смерть при БАС происходит при полном осознании пациентом происходящего от паралича дыхания при продолжающихся биениях сердца. Онкомаркеры – это онкоспецифические белки, появляющиеся в цитоплазме ОК в результате 4

—5 генетических мутаций ее генома. При БАС также описан в цитоплазме мотонейронов целый спектр патологических белков, возникающих в результате мутаций ряда генов, таких как SOD1, FUS, TD43 и др. Но обнаружение их молекул в крови не позволяет диагностировать БАС.

Роль иммунной системы в развитии рака, почти всех ЗНО и БАС принципиальна, хотя во многом неоднозначна и преимущественно негативна. Очевидно, что во всех случаях этих смертельных заболеваний имеет место избирательная (селективная) функциональная недостаточность иммунной системы (НИС), которая имеет важное значение в патогенезе и патоморфологии этих заболеваний. Так, при большинстве запущенных форм рака и ЗНО с распространенными метастазами иммунная система пациента никак не реагирует на генерализацию опухолевого процесса и наличие у больного первичных огромных опухолевых узлов и распространенных метастатических новообразований. Опухолевые клетки легко уклоняются от уничтожения натуральными киллерами врожденного иммунитета и цитотоксическими Т-клетками приобретенного иммунитета, и эти механизмы подробно описаны учеными. При этом при раке и при всех ЗНО избирательно нарушается только противоопухолевая функция иммунитета, а все другие функции иммунитета (противомикробная, противовирусная, противогрибковая, борьба с простейшими и т.д.) практически не страдают. Иммунный статус у этих онкобольных соответствует показателям нор-

мы или около нее. Аналогичная ситуация с иммунной системой наблюдается и при БАС. Несмотря на то что долгое время заболевание считали аутоиммунным, существенных количественных изменений клеточного и гуморального иммунитета при БАС не выявлено. Более того, в последние годы аутоиммунный генез БАС неврологи во всем мире вообще стали считать необоснованным, т.к. нет эффекта от применения стандартной терапии при аутоиммунных заболеваниях: 1) нет достижения ремиссии болезни при терапии глюкокортикоидными гормонами; 2) нет эффекта от аутологичной трансплантации костного мозга (ТКМ), как при рассеянном склерозе и других аутоиммунных болезнях соединительной ткани; и 3) нет результата от применения блокаторов интерлейкинов и других препаратов, направленных на уменьшение системного воспаления и деструкции ткани.

Однотипность иммунологических реакций организма при этих двух полярных заболеваниях позволяет предположить схожесть патогенетических механизмов их развития с определенными вариациями и особенностями их морфологического дефекта в клетках иммунной системы. Оба этих заболевания имеют в своей основе доказанный генетический дефект – статистически достоверные транскриптомные и протеомные нарушения, что позволило нам заподозрить, что в основе их молекулярно-биологического дефекта лежит повреждение ГСК как родоначальницы всех клеток системы кроветворения и иммунитета у человека. ГСК, или

стволовые кроветворные клетки, – очень малочисленная, но гетерогенная клеточная популяция, объединяющая в себе несколько типов (субпопуляций) клеток, отличающихся по уровням дифференцировки и способности к пролиферации. Среди них присутствуют как недифференцированные, практически не делящиеся стволовые клетки (СК), так и коммитированные (ограниченные в направлении дифференцировки) клетки-предшественники. Концентрация стволовых клеток (СК) в периферической крови в состоянии стабильного кроветворения мала – менее 0,01%, – что делает затруднительным их изучение даже самыми чувствительными методами (Гривцова, Тупицын, 2017). Но именно ГСК имеют самый большой клеточный цикл среди всех клеток организма человека (360 дней), являются основной регуляторной и управляющей системой в существующей иерархии всех клеточных систем организма, первыми реагируют на мутации генов в клетках и появление асептического воспаления в патологических тканях и органах, мигрируют туда на градиент концентрации воспаления из костного мозга, адгезируют к патологическим клеткам и «направляют их развитие» в сторону дифференцировки или апоптоза по механизму bystander effect. ГСК в зоне воспаления осуществляют горизонтальный и вертикальный информационный обмен цитоплазматическими белками с патологическими клетками (рис. 1, 2). Эти научные факты нами были изучены и опубликованы ранее в научной литерату-

ре (Брюховецкий И. С. и др., 2014; Милькина и др., 2016), они описывают универсальный механизм формирования патоспецифического протеома в ГСК. В зависимости от мутационного повреждения клеток-мишеней в тканях ГСК происходят геномно-протеомное повреждение ГСК и формирование из них опухолевых стволовых клеток или клеток, получивших вакцинацию иммуноспецифическими белками, что мы показали в своих исследованиях по онкопротеомике стволовых клеток (Брюховецкий А. С., 2014). Поэтому *целью настоящего способа диагностики* стало прицельное изучение и выявление патологической специфики протеомных профилей белковых маркеров клеточной поверхности ГСК при таких смертельных заболеваниях, как рак и другие ЗНО, а также БАС, что имеет большое значение для выявления уникальных иммуноспецифических характеристик молекулярного ландшафта клеточной поверхности ГСК как фундаментальных молекулярно-биологических критериев для ранней диагностики этих неизлечимых заболеваний.

# **Глава 4. Фундаментальные аспекты проблемы: взаимодействие гемопоэтических стволовых и опухолевых клеток *in vitro* (соавт. д.м. н. И.С. Брюховецкий)**

Одним из ключевых этапов эволюции многоклеточных организмов стало появление способности к специфическому координированному межклеточному взаимодействию, что сделало возможным согласованную регуляцию метаболизма, дифференциацию клеток и проявление физиологических функций дифференцированных клеток (акад. М. А. Пальцев, 2003). Вектор взаимодействия стволовой и дифференцированной клеток определяется локальными микроусловиями среды, однако только в патологии и клинике можно понять всю глубину адаптивных возможностей организма. В этой главе мы остановимся на закономерностях межклеточного взаимодействия ГСК с нормальными и патологически измененными, а именно опухолевыми клетками.

*Закономерности миграции гемопоэтических стволовых*

Для обоснования феномена направленной миграции ГСК в неопластический очаг и выявления некоторых механизмов реализации этого феномена был выполнен эксперимент *in vitro*, который проходил в 2 этапа:

1. исследование миграции стволовых клеток в сочетанных культурах с клетками различных линий;
2. исследование миграции стволовых клеток человека в сокультурах с клетками злокачественных опухолей различных типов.

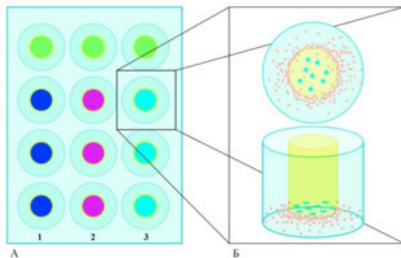
Использованы дермальные фибробласты человека (ATCC® PCS-201-012™), астроциты крысы (CTX TNA2 (ATCC® CRL-2006)), клетки злокачественной крысиной глиомы линии С6 (ATCC® CCL-107), линии U-87 MG (ATCC® HTB-14) и T-98G (ATCC® CRL-1690) глиобластомы человека, клетки линии MCA-7 аденокарциномы молочной железы (ATCC® HTB-22) и линии A549 (ATCC® CCL-185) карциномы легких человека, первичная культура CD34<sup>+</sup> ГСК человека (ATCC® PCS-800-012™). Перед началом эксперимента все клетки протестированы на контаминацию микоплазмой с помощью Universal Mycoplasma Detection Kit (ATCC® 30—1012K™).

Для изучения закономерностей миграции СК и выявления некоторых механизмов и особенностей реализации этого феномена выполнен эксперимент *in vitro*, который прохо-

дил в 2 этапа. Задачей первого этапа было выявление особенностей взаимодействия ГСК с опухолевыми и нормальными высокодифференцированными клетками – фибробластами и астроцитами.

*Миграция стволовых клеток млекопитающих в сочетанных культурах с клетками различных линий **in vitro***

Для создания сочетанных культур использовали культуральные вставки с размером пор 12 мкм (Millipore, США). Дно лунок культурального планшета (Grinner BioOne, США) покрывали полиэтиленмином, а затем ламинином (Gibco, США). В каждую лунку планшета помещали пористую культуральную вставку с диаметром пор 12 мкм, которую фиксировали каплей стерильного парафина (рис. 1). Планшет заполняли средой DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, США)) с пониженным содержанием глюкозы и добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) и 100 U/мл пенициллина (стрептомицина). Все реагенты производства компании Gibco (Thermo Fisher Scientific, Inc., США).



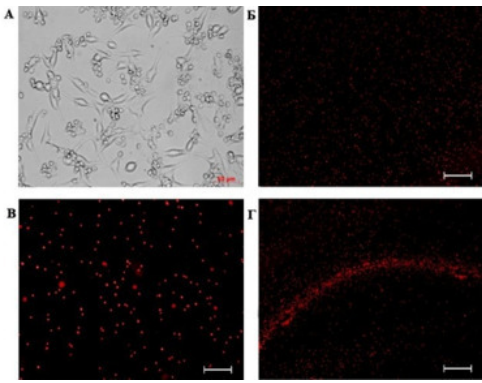
**Рис. 1.** #Схема эксперимента по изучению миграции СК *in vitro*. А. Общая схема эксперимента. Вставка содержит: 1 – клетки глиомы С6; 2 – астроциты; 3 – фибробласты. Зеленым выделены лунки, которые оставляли пустыми, для оценки пассивной миграции клеток. Б. Схематическое изображение наблюдаемого явления: клетки глиомы линии С6 индуцируют миграцию ГСК, которые формируют вал вокруг и проникают внутрь культуральной вставки

Внутри вставки вносили  $0,5 \times 10^4$  клеток глиомы С6, астроцитов или фибробластов, предварительно окрашенных витальным трейсером Vybrant™ CFDA SE CellTracer (кат. № V12883 Invitrogen™). Планшет с культуральными вставками инкубировали в течение 24 ч, затем на дно лунки планшета снаружи культуральной вставки высаживали по  $0,5 \times 10^4$  ГСК, предварительно окрашенных флуоресцентным маркером CellTracker™ Red CMTPX Dye (кат. № C34552, Invitrogen™).

Клетки культивировали 120 ч ( $37^\circ \text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). Подсчет

клеток, мигрировавших сквозь культуральную вставку, проводили с использованием высокоэффективной количественной микроскопии (Cell-IQ, CM Technologies, Великобритания) с временными отрезками 24—48—72—96—120 ч; регистрировали количество Red CMTPX Dye-позитивных объектов как на границе, так и внутри культуральной вставки. Полученные результаты верифицировали методом цитофлуориметрии.

Спустя 24 ч после начала совместного культивирования наблюдали формирование клеточного вала из флуоресцирующих клеток, располагающихся по периметру культуральной вставки с клетками глиомы. Этот феномен был отчетливо выражен в сокультурах, содержащих опухолевые клетки, и отсутствовал в лунках планшета, где стволовые клетки были совмещены с фибробластами и астроцитами (рис. 2 А—Г).



**Рис. 2.** #Перераспределение ГСК в планшете при совместном

культивировании через 24 ч. *А* – опухолевые клетки внутри культуральной вставки; *Б* – сокультура ГСК и фибробластов: формирование вала не наблюдается, увеличение 5х; *В* – сокультура ГСК и астроцитов: формирование вала не наблюдается, ув. 10х; *Г* – сочетанная культура ГСК и клеток глиомы С6 – формирование клеточного вала по периметру культуральной вставки, содержащей опухолевые клетки, ув. 5х

В культурах, содержащих опухолевые клетки, ГСК мигрировали сквозь культуральную вставку и визуализировались среди неокрашенных клеток глиомы в форме округлых объектов, отвечающих на воздействие лазера устойчивым флуоресцентным сигналом, регистрируемым в спектре, соответствующем Red CMTPX (577/602 нм). В культурах, содер-

жащих фибробласты и астроциты, регистрировались только единичные Red CMTPX-позитивные объекты. В культуральных вставках, оставленных пустыми, выявлялись только солитарные клетки, соответствующие спектру флуоресценции ГСК (табл. 2).

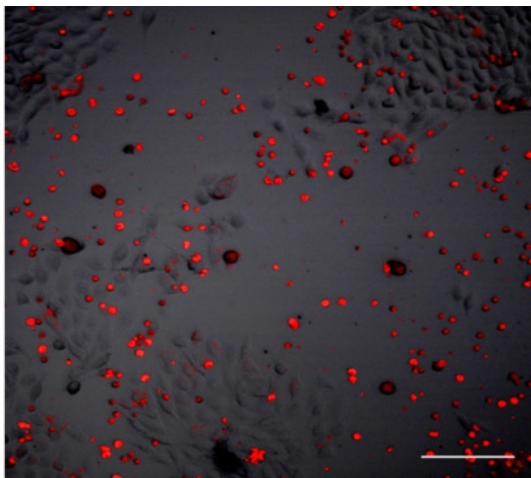
**Таблица 2.** Количество ГСК, расположенных по периметру и внутри культуральной вставки через 24 ч культивирования в различных сочетанных культурах (число клеток в 0,01 мм<sup>2</sup> площади)

	<b>С6</b>	<b>Астроциты</b>	<b>Фибробласты</b>	<b>Контроль</b>
Количество ГСК на границе культуральной вставки	33 ± 4	8 ± 2	14 ± 2	7 ± 3
Количество ГСК внутри культуральной вставки	80 ± 18	73 ± 6	61 ± 7	10 ± 3

**Примечание:** данные представлены в виде  $M \pm s.e.m.$ ,  $N = 12$  для каждой группы, по каждой точке.

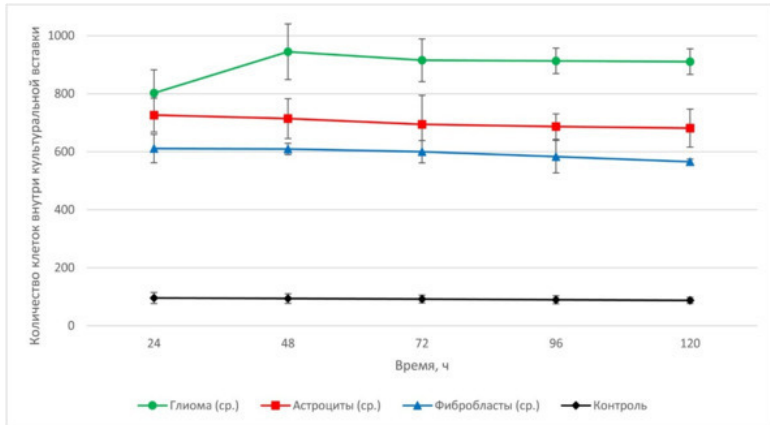
Подсчет числа ГСК, мигрировавших сквозь пористую мембрану или сосредоточенных по периметру культуральной вставки, показал четкое увеличение числа флуоресцирующих элементов в сокультурах, содержащих клетки глиомы,

начиная со 2-го по 5-й день эксперимента (рис. 3). Значимых динамических изменений числа ГСК на этапах совместного культивирования культур с астроцитами и фибробластами не наблюдали (рис. 4).



**Рис. 3.** #ГСК человека, мигрировавшие в лунки с глиомой С6.

Окраска CellTracker™ Red CMTPX. Конфокальная микроскопия, флуоресценция при воздействии лазера  $\lambda = 546$  нм; ув.: об. 10х



**Рис. 4.** #Динамика накопления стволовых клеток в культуральных вставках, содержащих клетки глиомы линии С6, астроциты, фибробласты, и в контрольных вставках. По оси абсцисс – время сокультивирования (24—48—72—96—120 ч), по оси ординат – число флуоресцирующих клеток во вставке ( $M \pm s.e.m.$ ,  $N = 9$  по каждой точке)

Очевидно, направленная миграция ГСК к клеткам глиомы обусловлена продукцией опухолевыми клетками сигнальных молекул. Поскольку в данном эксперименте были использованы клетки крысиной глиомы линии С6, способность ГСК мигрировать в отношении опухолевых клеток человека нуждалась в уточнении.

Очевидно, направленная миграция ГСК к клеткам глио-

мы обусловлена продукцией опухолевыми клетками сигнальных молекул. Поскольку в данном эксперименте были использованы клетки крысиной глиомы линии С6, способность ГСК мигрировать в отношении опухолевых клеток человека нуждалась в уточнении.

### *Миграция стволовых клеток человека в сочетанных культурах с клетками злокачественных опухолей различных линий*

В данном эксперименте использованы клетки аденокарциномы молочной железы и карциномы легких человека; кроме того, 2 типа клеток глиобластомы: а) клетки общего пула опухоли; б) опухолевые стволовые клетки (ОСК) глиобластомы.

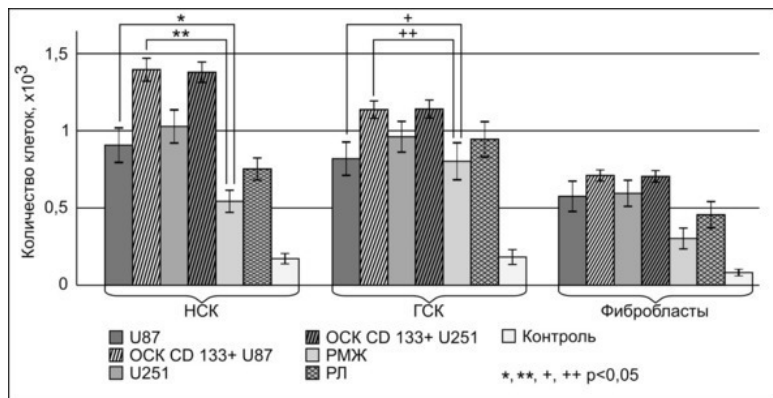
Для получения ОСК клетки глиобластомы культивировались в среде DMEM (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.) без добавления сыворотки, с добавлением L-глутамина (2 мМ), В-27 (0,5 мМ), основного фактора роста фибробластов (20 нг/мл), эпидермального фактора роста (20 нг/мл), пенициллина / стрептомицина (100 ед./мл) и гепарина (5 мкг/мл). ОСК выделяли из глиомасфер на основании экспрессии антигена CD133, используя MicroBead (кат. №130-100-857; Miltenyi Biotec, Inc.). Чистота популяции ОСК, по данным проточной цитометрии (антитела CD133/1-VioBright FITC (кат. №130-105-226; Miltenyi Biotec, Inc.)),

составила 96,72%.

Все опухолевые клетки и фибробласты (контроль), используемые в эксперименте, окрашивали Vybrant™ CFDA SE CellTracer, вносили внутрь культуральной вставки в количестве  $0,5 \times 10^4$ . Пространство снаружи культуральной вставки планшета заполняли нейральными прогениторными клетками (НПК) человека (Neural Progenitor Cell Origin ATCC-BXS0117 Normal; Human (ATCC® ACS-5003™)), или ГСК человека в количестве  $0,5 \times 10^4$ . Клетки были окрашены флуоресцентным маркером CellTracker Red CMTPX Dye. Культивирование проводили в течение 120 ч при стандартных условиях. Результаты сравнительного анализа миграционной активности клеток в смешанных культурах представлены на рис. 5.

Нейральные прогениторные клетки (НПК) обладали существенно большей подвижностью при сокультивировании с CD133<sup>+</sup> ОСК линий U-87 и T98G (+926 и +913,1% от контроля). Аттрактивность НПК в отношении общего пула клеток линий U-87 и U-251 была менее выраженной (+598,7 и +688,8% от контроля) и сопоставима с опухолевыми клетками иного происхождения. ГСК, несколько уступая НПК в способности мигрировать к CD133<sup>+</sup>-клеткам глиобластомы, тем не менее активно мигрировали к этим клеткам (+618,2% к ОСК U-87 и +623,8% к ОСК T98G по сравнению с контролем). Общий пул клеток глиобластомы об-

ладал меньшей аттрактивностью для ГСК (U-87 +449,2% и T98G +523,7% в сравнении с контролем), что сопоставимо с миграцией ГСК к клеткам рака молочной железы (439,2%) и рака легкого (516,8%).



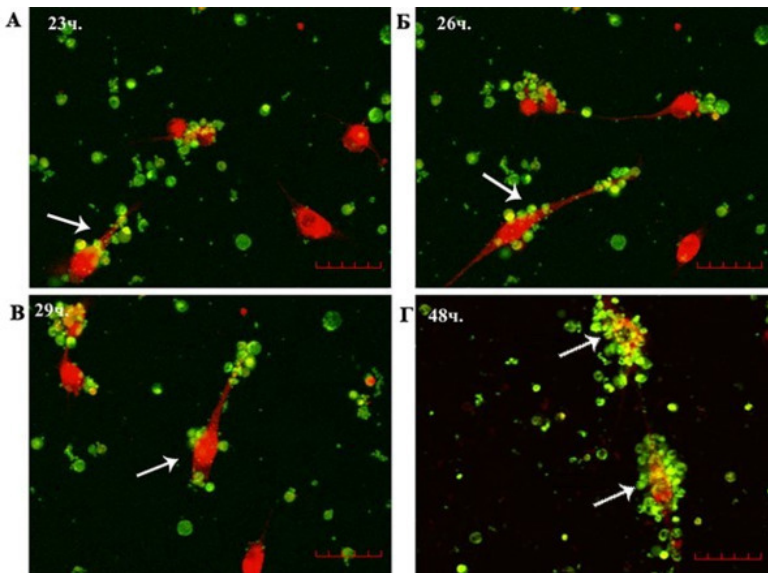
**Рис. 5.** #Количество НПК, ГСК и фибробластов, мигрировавших через культуральную вставку, через 120 ч совместного культивирования. По оси ординат – количество клеток  $\times 10^3$ , данные представлены в виде  $M \pm s.e.m.$ ,  $N = 15$  для каждой группы

Обращала внимание выраженная сильная способность глиобластомы привлекать высокодифференцированные клетки – фибробласты. При этом наилучшей подвижностью эти клетки обладали в отношении ОСК (U-87 +897,6% и T98G +889%); клетки общего пула глиобластомы облада-

ли несколько меньшей способностью индуцировать миграцию фибробластов, которая была сопоставима с неопластическими клетками рака молочной железы (380,9%) и легкого (574,9%).

Итак, нейральные прогениторные клетки обладали существенно большей подвижностью к клеткам глиобластомы в сравнении с клетками других типов. Миграционная активность НПК зависела от типа опухолевых клеток в сокультуре, и они более активно мигрировали к ОСК двух типов глиобластомы. Дифференцированные клетки глиобластомы обладали несколько меньшей способностью индуцировать миграцию НПК, однако опухолевые клетки ненейронального происхождения существенно слабее индуцировали процессы миграции нейральных стволовых клеток.

Следует отметить, что по мере приближения ГСК к культуральной вставке и их проникновения внутрь в популяции клеток глиобластомы индуцировалась высокая подвижность. В серии снимков, выполненных в режиме реального времени, с интервалом 3 ч (через 23, 26, 29 и 48 ч после начала эксперимента), видно, что клетки глиобластомы активно передвигались по дну планшета внутри культуральной вставки и как бы собирали мигрирующие к ним ГСК. Через 48 ч наблюдения практически все неопластические клетки были «облеплены» мигрирующими клетками (рис. 6).



**Рис. 6.** #Динамический ряд клеток U-87 глиобластомы в сокультуре с  $CD34^+$  ГСК. Опухолевые клетки окрашены CellTracker™ Red CMTPX (красный), а ГСК – Vybrant® CFDA SE (зеленый). Стрелкой показана активно перемещающаяся клетка глиобластомы, к поверхности которой адгезируют ГСК. А – 23 ч, Б – 26 ч, В – 29 ч, Г – 48 ч. Флуоресцентная лазерная микроскопия в режиме реального времени. Масштаб 400 мкм

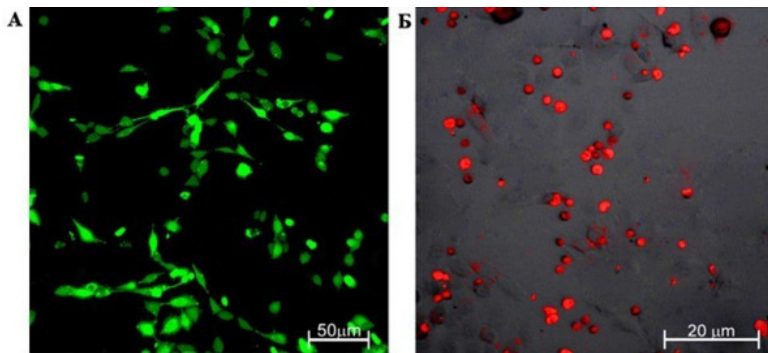
*Взаимодействие стволовых клеток человека с клетками злокачественных опухолей in vitro*

Способность нормальных стволовых клеток мигрировать и взаимодействовать с опухолевыми клетками требует изучения закономерностей такого взаимодействия. Для ответа на эти вопросы была выполнена серия экспериментов *in vitro*, в которых использованы клетки глиомы линии С6, глиобластомы линии U-87, клетки аденокарциномы легкого линии A549 и рака молочной железы MCF-7. Для каждой модели выполнены визуальное и цитометрическое изучение процесса взаимодействия ГСК с опухолевыми клетками и автоматизированный мониторинг процесса сокультивирования стволовых и опухолевых клеток в соотношении 3:1; 1:1 и 1:3 в режиме реального времени.

### *Взаимодействие гемопоэтических стволовых клеток на модели глиомы линии С6*

В рамках подготовки экспериментов  $0,5 \times 10^6$  клеток глиомы линии С6 после окраски витальным трейсером CFDA SE были внесены в лунки планшета, где инкубировались при стандартных условиях. Спустя 6 ч неприкрепившиеся опухолевые клетки были отобраны и в культуру внесено  $0,5 \times 10^6$  ГСК, окрашенных флуоресцентным трейсером Red CMTPX. В качестве контроля использовали фибробласты, которые после окраски маркером Red CMTPX вносили в культуру опухолевых клеток в соотношении 1:1.

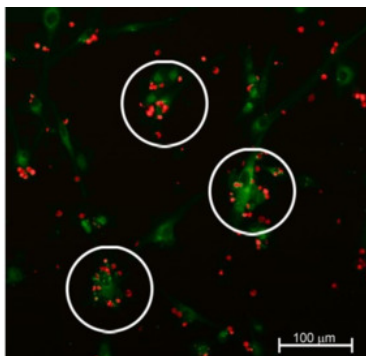
Через 6 ч клетки линии С6 визуализировались в виде веретеновидных или полигональных образований, отвечающих стойким флуоресцентным сигналом на воздействие лазера ( $\lambda = 488$  нм). В свою очередь, ГСК при воздействии лазера другого типа ( $\lambda = 546$  нм) формировали флуоресцентный сигнал, визуализируясь в форме округлых образований (рис. 7 А, Б).



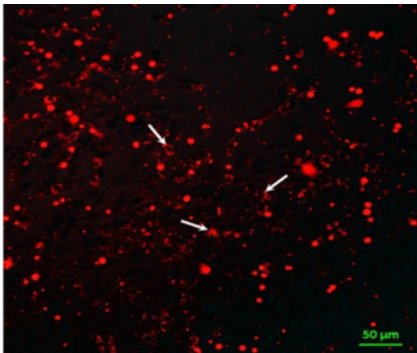
**Рис. 7.** #Флуоресценция сокультивируемых клеток, 6 ч с начала эксперимента *in vitro*. А – клетки глиомы линии С6, окраска CFDA SE ( $\lambda = 488$  нм); Б –  $CD34^+$  стволовые клетки крысы, окраска CMTPX ( $\lambda = 546$  нм). Флуоресцентная лазерная микроскопия

Спустя 12 ч ГСК адгезировали к клеткам глиобластомы и визуализировались на поверхности клеток глиомы С6 в виде красных флуоресцирующих объектов (рис. 8).

Спустя 24 ч наблюдения в цитоплазме клеток глиомы стали появляться включения красного флуорохрома, что означало присутствие красителя Red CMTPX, ковалентно связанного с белками цитоплазмы ГСК в процессе окраски (рис. 9). Это явление достигало максимума через 48 ч с начала эксперимента, сохранялось до конца исследования и отсутствовало в контрольной культуре с фибробластами.



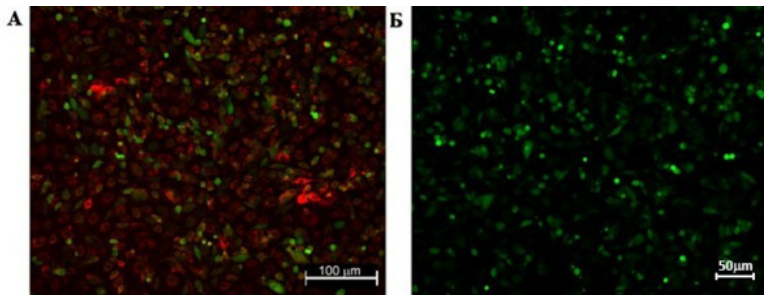
**Рис. 8.** Аггезия ГСК (CMTPX,  $\lambda = 546$  нм) к поверхности клеток глиомы (CFDA SE,  $\lambda = 488$  нм), 12 ч. Мультифотонная флуоресцентная лазерная микроскопия. ГСК визуализируются в виде цилиндров красного цвета на поверхности клеток глиомы



**Рис. 9.** #Перенос флуоресцентной метки СМТРХ из ГСК в клетки линии С6. Флуоресцентная лазерная микроскопия *in vitro*. Стрелками показано накопление красителя в сокультивируемых клетках

При визуальном наблюдении перенос флуоресцентной метки был заметен в направлении от ГСК к клеткам глиомы, поскольку через 48 ч накопление флуоресцентного красителя СМТРХ отмечено именно в цитоплазме клеток линии С6.

Спустя 120 ч контрольная культура опухолевых клеток отвечала на воздействие лазера ( $\lambda = 488$  нм) устойчивым флуоресцентным сигналом, визуализируя четкую форму клеток глиомы без признаков обмена флуоресцентной меткой с ГСК (рис. 10 А, Б).



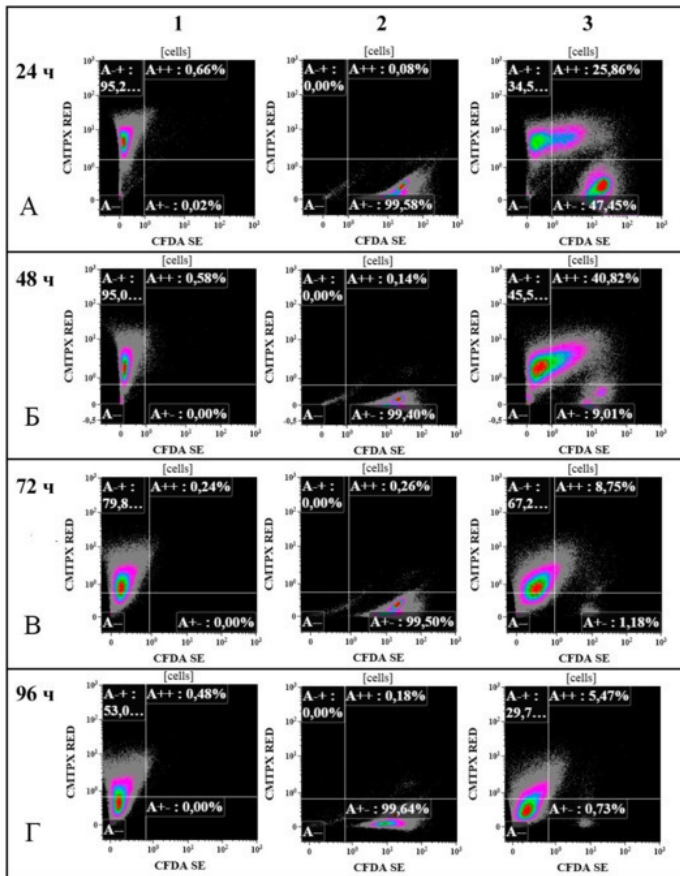
**Рис. 10.** Сокультура ГСК (СМТРХ,  $\lambda = 546$  нм) с клетками глиомы С6 (CFDA SE,  $\lambda = 488$  нм). *А* – клетки линии С6 отвечают на воздействие лазеров 2 типов; *Б* – клетки глиомы отвечают стойким флуоресцентным сигналом на воздействие лазера  $\lambda = 488$  нм, что свойственно красителю CFDA SE, которым они изначально окрашены. Флуоресцентная лазерная микроскопия, 120 ч эксперимента

Таким образом, при наблюдении взаимодействия 2 популяций совместно культивируемых клеток, окрашенных разными красителями, было обнаружено, что клетки не только мигрируют и адгезируют друг к другу, но и осуществляют перенос флуорохрома в соседние клетки.

Результаты цитологического мониторинга подтверждают-ся при цитофлуориметрической оценке сокультуры на разных этапах эксперимента (24, 48, 72, 96 ч). Методом точной цитофлуориметрии показано, что наиболее активное взаимодействие клеток происходит в период 24—48 ч (рис.

11 А, Б), что проявляется накоплением в неопластических клетках флуоресцентной метки.

Число клеток, содержащих двойную окраску, изменяется динамически: через 24 ч в культуре обнаруживается 25,8% дважды меченых клеток, через 48 ч – 40,82%, через 72 ч – 8,75%, через 96 ч – 5,47%. При этом по мере увеличения срока наблюдения тенденция к исчезновению ГСК в смешанной культуре становилась все очевиднее. Так, на 24 ч количество ГСК составляло 47,45%, к 48 ч эксперимента их количество сократилось до 9,01%, критически уменьшилось – к 72 ч (1,18%), а к 96 ч количество ГСК в сокультуре составило 0,73% (рис. 12 В, Г).



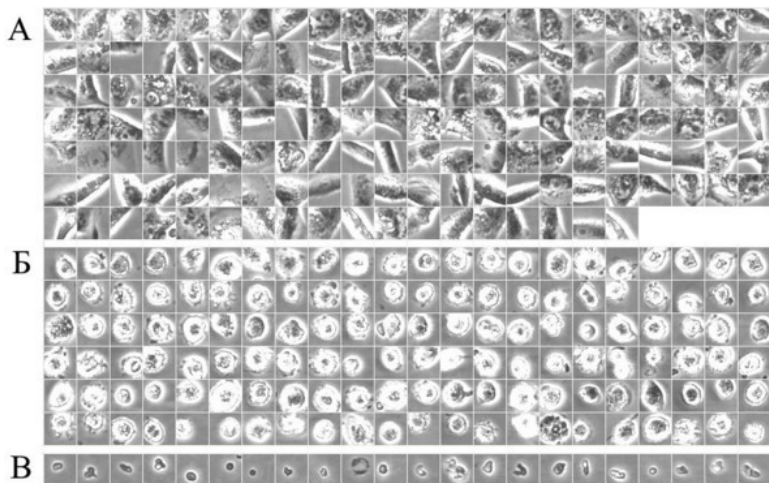
**Рис. 11.** #Результаты сокультивирования ГСК (CFDA SE,  $\lambda = 488$  нм) и глиомы C6 (Red CMTPX,  $\lambda = 546$  нм) при исходном соотношении клеточных популяций 1:1. (A—+) – клетки, окрашенные CFDA SE,  $\lambda = 488$  нм; (A+—) – клетки,

окрашенные Red CMTPX,  $\lambda = 546$  нм; (A—) – клетки погибшие либо потерявшие окраску; (A++) – область с клетками, включившими окраску обоими красителями. Для контроля использованы чистые клеточные культуры ГСК и глиомы С6, окрашенные маркерами Red CMTPX,  $\lambda = 546$  нм и CFDA SE,  $\lambda = 488$  нм соответственно. А – анализ клеток через 24 ч; Б – анализ клеток через 48 ч; В – анализ клеток через 72 ч; Г – анализ клеток через 96 ч

Важно отметить, что в контролях количество клеток глиомы С6 закономерно уменьшалось, что, вероятно, следует объяснить ускоренными темпами пролиферации неопластических клеток, которые постепенно утрачивают флуоресцентную метку. Однако и в сокультуре С6/ГСК количество монопозитивных клеток линии С6 уменьшается, при этом монопозитивных клеток на 96 ч эксперимента в сокультуре с ГСК значительно меньше, чем в контроле. Сказанное выше свидетельствует в пользу переноса флуоресцентной метки из ГСК в опухолевые клетки на ранних сроках сокультивирования (до 48 ч). При этом на более поздних сроках (48—96 ч) клетки глиомы особенно интенсивно накапливали флуоресцентную метку от ГСК. Важно отметить, что в ходе сокультивирования популяция клеток ГСК практически исчезла на поздних сроках (120 ч).

Для изучения эффектов взаимодействия ГСК с опухоле-

выми клетками интеллектуальная система мониторинга Cell-IQ была настроена на распознавание образов и подсчет числа живых и мертвых клеток в режиме реального времени. Под живыми клетками понималась итоговая сумма образов интерфазы и митоза (2).



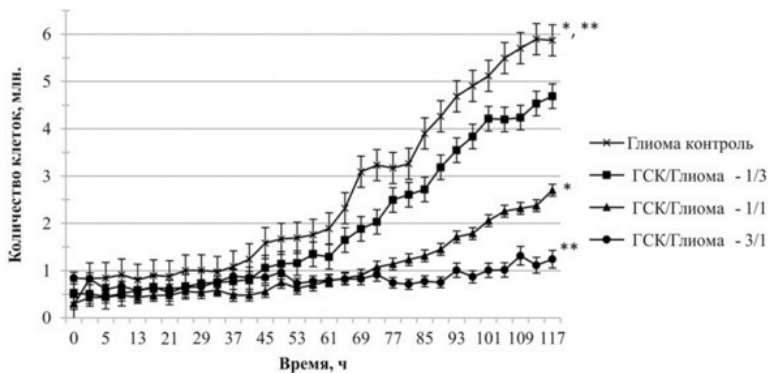
**Рис. 12.** #Образы опухолевых клеток по данным системы Cell-IQ.

*А* – адгезировавшие клетки; *Б* – неадгезировавшие пролиферирующие клетки (в т.ч. с признаками ранней профазы); *В* – мертвые клетки

Термином «пролиферирующие» были обозначены клетки, обнаруживающие прекращение функциональной актив-

ности, имеющие отчетливые признаки открепления от субстрата и характеризующиеся увеличением объема ядра и клетки в целом, округлыми контурами клеточной мембраны и светлой цитоплазмой с отсутствием патологических включений, а также другими морфологическими признаками ранней профазы. При подсчете пролиферирующих клеток также учитывались клетки, находящиеся в митозе.

Динамическое наблюдение числа опухолевых клеток, сокультивируемых с ГСК, показало зависимость антипролиферативного эффекта от соотношения внесенных в культуру клеток. К концу эксперимента кривая нарастания числа живых клеток в сокультуре С6/ГСК при соотношении 3:1 не обнаруживала значительных отличий от контрольной культуры клеток линии С6 (рис. 13).



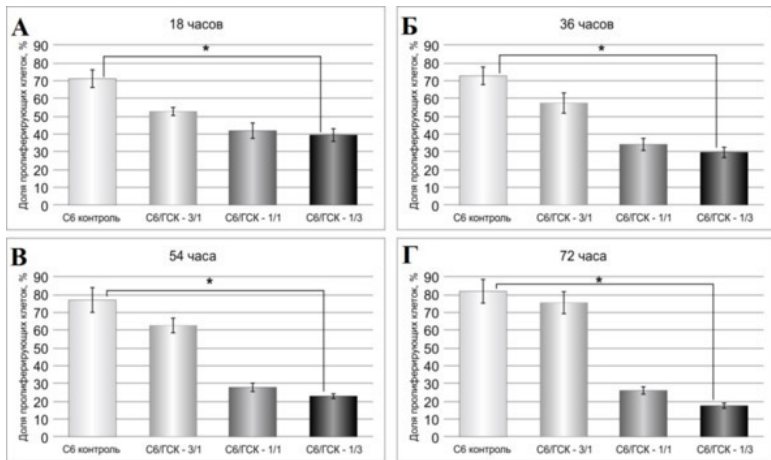
**Рис. 13.** #Результаты сокультивирования клеток линии С6

с ГСК. По оси абсцисс – время эксперимента (ч), по оси ординат – количество клеток линии С6 в сокультурах с ГСК. Данные приведены в виде  $M \pm s.e.m.$ ,  $n = 30$  по каждой точке. Знаком \* показаны достоверные ( $p < 0,05$ ) различия в количестве клеток линии С6 в сокультуре с ГСК/С6 в соотношении 1:1 и знаком \*\* в соотношении 3:1 по сравнению с контрольной

культурой С6

При сокультивировании клеток линии С6/ГСК в соотношении 1:1 и более к 120 ч эксперимента сократилось как общее число опухолевых клеток, так и количество пролиферирующих клеток, определяемых с помощью иммуноцитохимической окраски на PCNA (рис. 14).

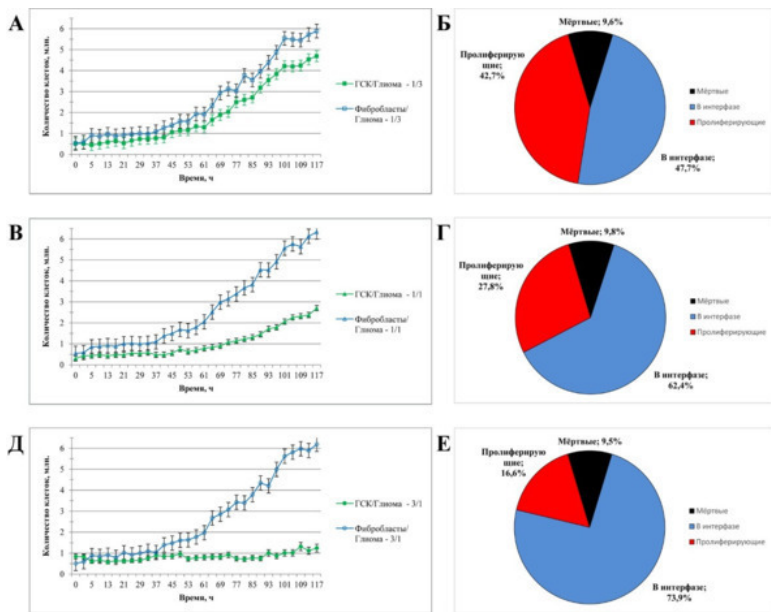
При сокультивировании с клетками глиомы С6 в соотношении 1:1 ГСК оказывали на них цитостатический эффект. При увеличении количества ГСК в сочетанной культуре до 1:3 этот эффект был более очевидным, что свидетельствует о способности ГСК подавлять пролиферацию опухолевых клеток *in vitro*, зависящей от числа внесенных стволовых клеток (рис. 15).



**Рис. 14.** #Количество PCNA-позитивных клеток в сокультурах глиомы С6/ГСК в ходе эксперимента. А – 18 ч, Б – 36 ч, В – 54 ч, Г – 72 ч. По оси ординат указано количество пролиферирующих клеток, % от общего числа клеток в сокультуре. Данные приведены в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение),  $n = 18$  по каждой точке. Знаком \* показаны достоверные ( $p < 0,05$ ) отличия между числом PCNA-позитивных клеток в сокультуре С6/ГСК в соотношении 1:3 в сравнении с контролем. Различия особенно очевидны на сроке 72 ч

Таким образом, совместное культивирование ГСК с клетками глиомы линии С6 сопровождается адгезией ГСК к опухолевым клеткам, взаимодействием с ними, развитием антипролиферативного эффекта, при этом противоопухолевый

потенциал таких взаимодействий возрастает по мере увеличения количества стволовых клеток в анализируемой системе.

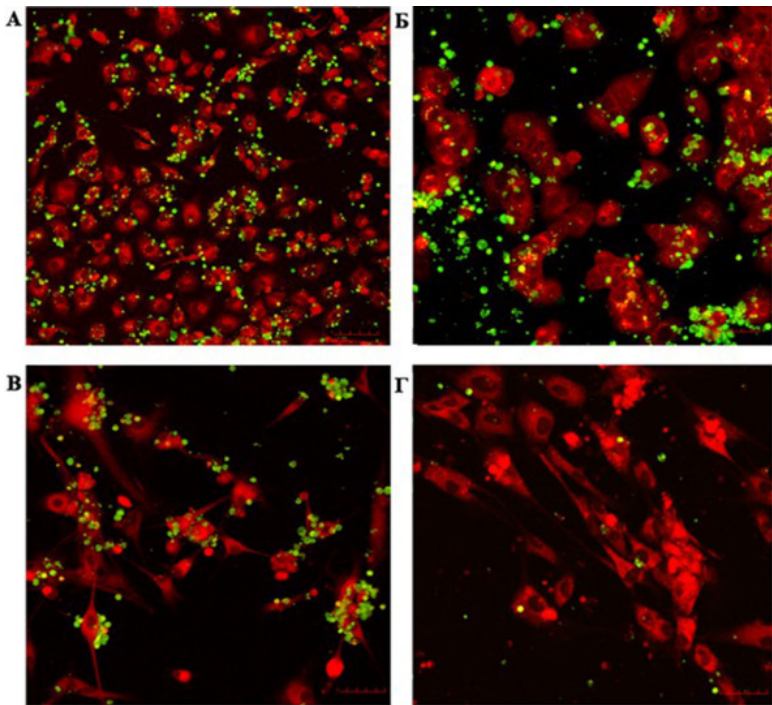


**Рис. 15.** #Динамика количества клеток линии С6 при сокультивировании с ГСК по данным высокоэффективной количественной микроскопии в реальном времени. Сокультивирование клеток С6/ГСК: А – 1:3, Б – 1:1, В – 3:1. В качестве контроля использована культура фибробластов; по оси абсцисс – время в ч, по оси ординат – количество клеток, млн.

Данные приведены в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение),  $n = 18$  по каждой точке. *Б, Г, Е* – указано распределение клеток глиомы С6 на 117 ч наблюдения в соответствующих сокультурах по данным Cell-IQ

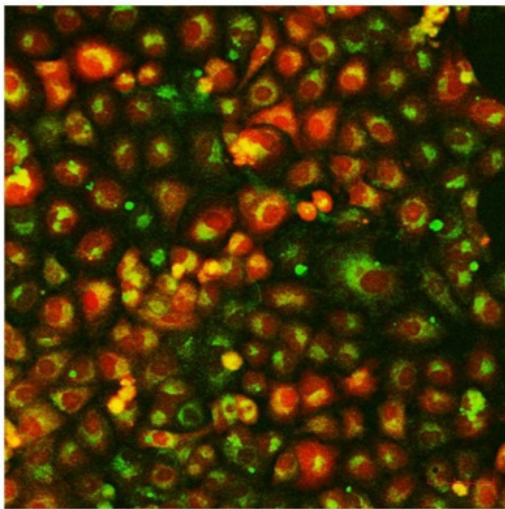
*Взаимодействие гемопоэтических стволовых клеток с клетками злокачественных опухолей человека*

Во второй части эксперимента изучалось *in vitro* взаимодействие ГСК человека с клетками линии U-87 глиобластомы человека, линии A549 рака легких человека и линии MCF-7 рака молочной железы человека. Спустя 24 ч наблюдений отмечали адгезию ГСК к поверхности опухолевых клеток различных линий (рис. 16).



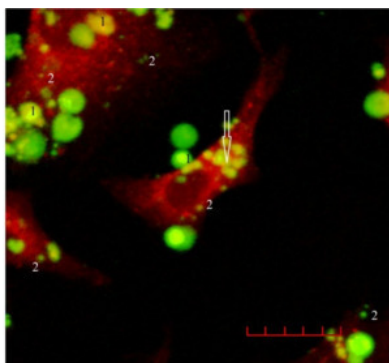
**Рис. 16.** #Адгезия ГСК (окраска CFDA SE,  $\lambda = 488$  нм) к поверхности опухолевых клеток: *A* – рака легких, *B* – аденокарциномы молочной железы, *V* – глиобластомы (окрашены CMPTX,  $\lambda = 546$  нм); *Г* – сокультура фибробластов человека и ГСК, признаки адгезии отсутствуют. Флуоресцентная лазерная микроскопия, 24 ч эксперимента. Соотношения клеток 1:1. Масштаб 400 мкм

Спустя 48 ч в цитоплазме опухолевых клеток стали проявляться включения зеленого флуоресцентного красителя CFDA SE, которым предварительно были окрашены ГСК. Признаки обмена флуоресцентной меткой были заметны во всех сокультурах, однако особенно очевидны в сокультуре ГСК с клетками рака легких A549/ГСК (рис. 17).

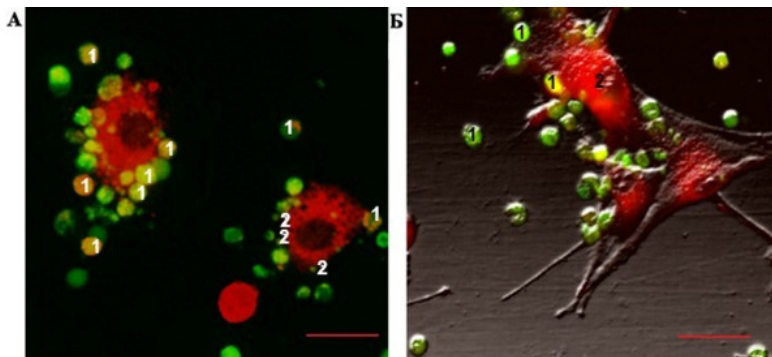


**Рис. 17.** #Накопление зеленой флуоресцентной метки в клетках рака легких линии A549 (изначально окрашены витальным трейсером Red CMPTX;  $\lambda = 546$  нм, красный) при сокультивировании с ГСК (CFDA SE;  $\lambda = 488$  нм, зеленый), 48 ч эксперимента. Лазерная сканирующая микроскопия в реальном времени. Масштаб 400 мкм

Описанный феномен был выражен среди всех линий опухолевых клеток и визуализировался с использованием мультифотонной микроскопии, что позволяет отличить транспорт флуоресцентной метки от возможного свечения ГСК, распластавшихся по поверхности опухолевых клеток. На данном сроке эксперимента транспорт флуоресцентной метки проходил только в направлении из ГСК в опухолевые клетки, однако с увеличением времени до 48—72 ч в спектре свечения ГСК, адгезировавших к поверхности клеток глиобластомы, начинали преобладать желтые тона (рис. 18, 19), что отчасти может быть связано с пересечением спектров флуоресцентного сигнала, отраженного от окрашенных SFDA ( $\lambda = 488$  нм), и распластавшихся по их поверхности ГСК, окрашенных красителем Red CMTPX ( $\lambda = 546$  нм).



**Рис. 18.** #Взаимодействие ГСК с опухолевыми клетками при сокультивировании в соотношении 1:1 в течение 48 ч. 1 – появление оранжево-желтого оттенка в цитоплазме ГСК, которые адгезировали к клеткам глиобластомы линии U-87. Неопластические клетки изначально окрашены витальным трейсером CMPTX ( $\lambda = 546$  нм, красный), ГСК – CFDA SE ( $\lambda = 488$  нм, зеленый); 2 – при этом как на поверхности, так и, возможно, в цитоплазме (указано стрелкой) клеток глиобластомы отчетливо заметны флуоресцентные тельца диаметром значительно меньше ГСК. Флуоресцентная лазерная микроскопия. Масштаб 600 мкм



**Рис. 19.** #Взаимодействие ГСК с опухолевыми клетками при сокультивировании в соотношении 1:1 в течение 72 ч. А – (1) накопление оранжево-желтого оттенка в цитоплазме ГСК, которые адгезировали к клеткам глиобластомы линии U-87. Неопластические клетки изначально окрашены

витальным трейсером CMPTX ( $\lambda = 546$  нм, красный), ГСК – CFDA SE ( $\lambda = 488$  нм, зеленый); (2) на поверхности клеток глиобластомы видны флуоресцентные тельца диаметром значительно меньше ГСК. *Б* – взаимодействие ГСК (1) с клетками глиобластомы (2). Флуоресцентная лазерная микроскопия. Масштаб 600 мкм

Анализ спектра флуоресценции ГСК, адгезировавших к поверхности клетки глиобластомы, свидетельствует об увеличении в нем количества оранжево-желтых оттенков, что может быть связано с присутствием в ГСК красителя Red CMPTX, привнесенного из клеток глиобластомы в процессе межклеточного взаимодействия. Отметим, что с увеличением срока культивирования признаки переноса флуоресцентной метки не только из ГСК в ОК и наоборот были отмечены во всех сокультурах, но в контрольной культуре такие феномены зарегистрированы не были. По результатам ЦФМ, через 24 ч в сокультуре A549/ГСК регистрировалось  $9,6 \pm 1,3\%$  клеток, позитивных по 2 красителям (рис. 20).

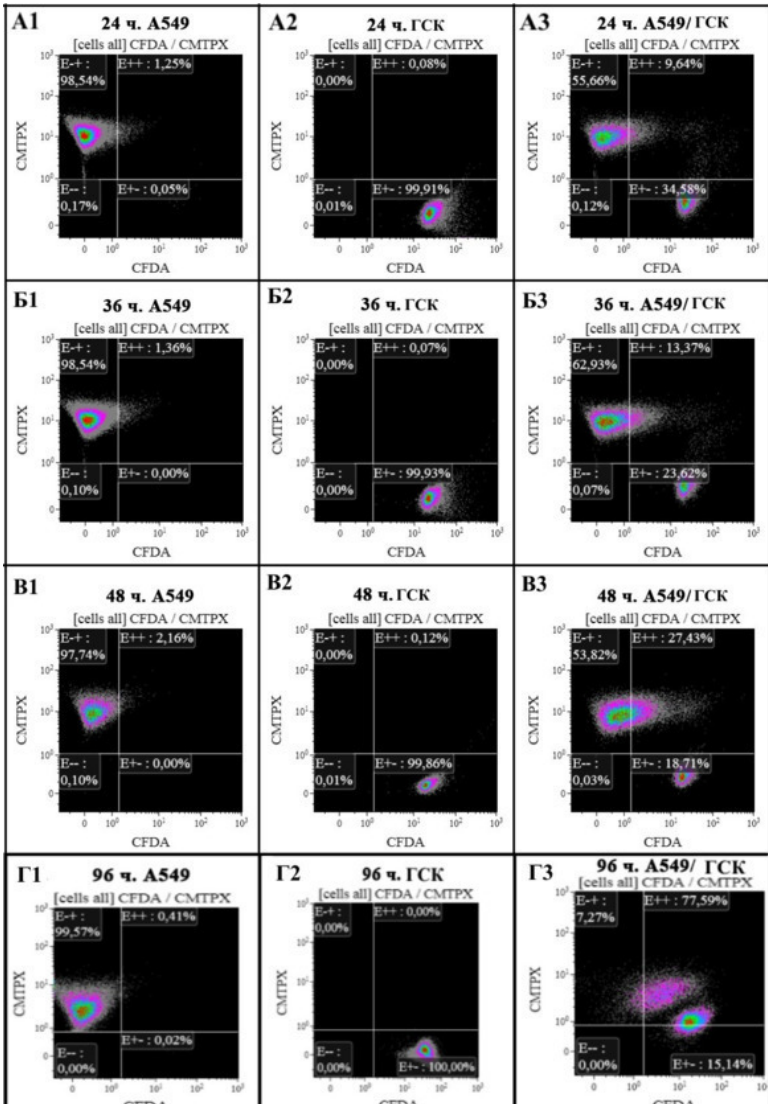
Через 36 ч совместного культивирования число дважды позитивных клеток возрастало до  $13,3 \pm 0,8\%$ . Через 48 ч с момента начала исследования число дважды позитивных клеток достигло  $27,4 \pm 1\%$ , а к 96 ч наблюдения количество таких клеток увеличилось до  $77,5 \pm 4\%$ . Важно отметить, что параллельно увеличению количества дважды позитивных клеток уменьшалось число монопозитивных ГСК.

По данным программы Kaluza, увеличение числа дважды позитивных клеток происходило за счет клеток линии A549 (табл. 3).

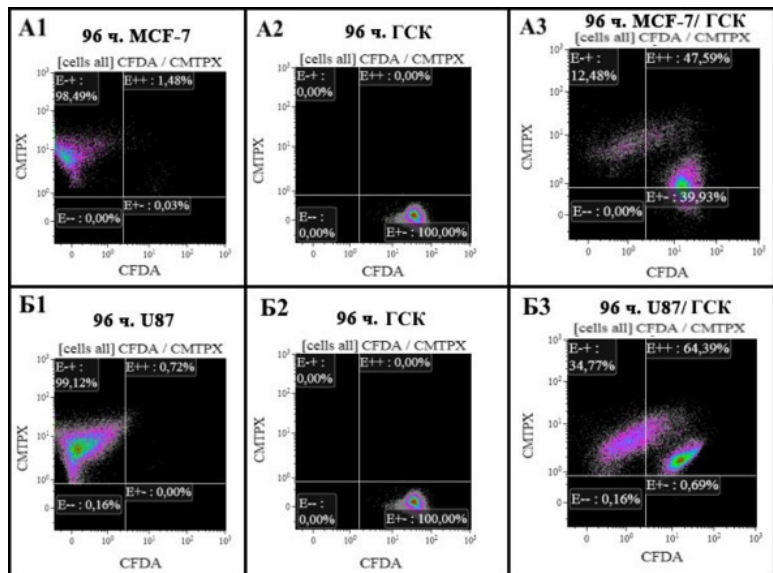
**Таблица 3.** Количество клеток, позитивных в отношении 2 флуоресцентных меток, при совместном культивировании клеток рака легкого A549 с ГСК, по данным проточной цитофлуориметрии с использованием красителей CFDA и CMTPX. Обработка данных программой Kaluza

Время, прошедшее с начала эксперимента, ч	Среднее число дважды позитивных клеток линии A549, %	Среднее число дважды позитивных ГСК, %
<b>24</b>	12,62 ± 0,64	3,43 ± 0,53
<b>36</b>	16,40 ± 0,37	2,46 ± 0,12
<b>48</b>	30,8 ± 2,70*	0,37 ± 0,02*

**Примечание:** данные представлены в процентах от общего числа клеток каждой группы, в  $M \pm s.e.m.$ ,  $n = 9$  по каждой точке. \* – число дважды позитивных опухолевых клеток через 48 ч наблюдений; достоверно ( $p < 0,05$ ) отличается от количества дважды позитивных ГСК.



**Рис. 20.**# Гистограммы распределения клеток в сокультуре рака легких с ГСК по данным цитофлуориметрии с использованием флуоресцентных красителей: 36 ч с начала эксперимента; *A1, B1, B1, Г1* – клетки рака легкого, контроль; *A2, B2, B2, Г2* – гемопоэтические стволовые клетки, контроль; *A3, B3, B3, Г3* – сокультура ГСК с клетками рака легкого линии A549



**Рис. 21.**# Гистограммы распределения в сокультуре клеток рака молочной железы и глиобластомы с ГСК по данным цитофлуориметрии с использованием флуоресцентных кра-

сителей: А1 – клетки рака молочной железы линии MCF-7, контроль; А2 – гемопоэтические стволовые клетки, контроль; А3 – сокультура ГСК с клетками рака молочной железы линии MCF-7; Б1 – клетки глиобластомы линии U-87, контроль; Б2 – гемопоэтические стволовые клетки, контроль; Б3 – сокультура ГСК с клетки глиобластомы линии U-87

В свою очередь, уменьшение числа монопозитивных стволовых клеток может быть связано с гибелью части популяции ГСК под токсическим воздействием нарастающего количества продуктов жизнедеятельности неопластических клеток. Существенное увеличение количества дважды позитивных клеток наблюдалось к 96 ч эксперимента и в других сокультурах. Так, число клеток, позитивных в отношении 2 красителей, составляло 47,5% в сокультуре ГСК с клетками MCF-7 и 64,3% в сокультуре ГСК с клетками глиобластомы (рис. 21). При этом в сокультуре ГСК с клетками глиобластомы к концу эксперимента практически не осталось монопозитивных ГСК.

### *Обсуждение полученных данных*

Как следует из данных эксперимента *in vitro*, стволовые клетки обладают подвижностью по отношению к клеткам других типов, которая особо выражена по отношению к опу-

холевым клеткам. В свою очередь, миграционная активность СК нейрального и ненейрального происхождения сильно различается по отношению к опухолевым клеткам нейроглиального и ненейроглиального рядов. Очевидно, данный факт иллюстрирует собой важную закономерность: стволовые и опухолевые клетки, полученные из одного источника, обладают максимальной степенью аттракции в отношении друг к другу. Этот факт хорошо иллюстрирует высокая подвижность клеток глиобластомы в пределах культуральной вставки по направлению к стволовым клеткам, мигрирующим сюда сквозь ее поры.

Однако заслуживает особого внимания тот факт, что подвижность НПК в отношении различных типов клеток линии глиобластомы тоже совсем неодинакова. Так, дифференцированные клетки 2 типов глиобластомы в 5 и 6 раз соответственно превосходят их подвижность в контроле, однако миграционная активность этого НПК в отношении ОСК превосходит контроль практически на порядок.

Высокая подвижность НПК по отношению к различным типам опухолевых клеток не является неожиданностью. Способность к непрерывной миграции из первичных герминативных зон головного мозга – одно из важнейших свойств нейральных стволовых клеток (Ярыгин, 2015; Aboody et al., 2013) и их прямых потомков – нейральных прогениторных клеток (Benedetti, 2000). Мигрируя из субвентрикулярной зоны головного мозга, потоки НСК ориентируются

по градиенту концентрации сигнальных молекул (Doetsch et al., 1999), продуцируемых эндотелием кровеносных сосудов, что позволяет провести параллели. Периваскулярный способ инвазии клеток МГБ также характеризуется миграцией опухолевых элементов по пространствам Вирхова – Робина, а также распространением вдоль пенетрирующих паренхиму мозга артерий, артериол и вен. В этой связи аргументом в пользу единства механизмов, определяющих специфические взаимоотношения НПК и ОСК, являются указания на способность растущей в мозге МГБ опустошать первичные герминативные центры мозга, что довольно подробно проиллюстрировано в работах Najbauer (2012), Walzlein (2008), Ярыгина (20015), Цимбалука (2005) и других авторов.

Данное обстоятельство свидетельствует в пользу наличия прямой связи ОСК глиобластомы и нормальных СК головного мозга человека и высших млекопитающих и, конечно, служит весомым аргументом, позволяющим рассматривать СК как важный фактор патогенеза глиом. Нельзя исключить, что способность опухоли привлекать СК наводит на мысль, что запуск и поддержание миграционной активности опухолевых клеток в значительной мере обеспечивается субпопуляцией стволовых клеток.

Относительно слабая способность культур клеток линии МСА-7 рака молочной железы и А549 рака легкого привлекать СК не должна вводить в заблуждение. Рак молочной же-

лезы – гормонально зависимая опухоль, которая по распространённости и масштабу летальности уступает только раку легких, лидирующему в общемировой статистике онкологической смертности. Не исключено, что способность привлекать стволовые клетки может быть связана с многочисленными пассажами этих линий *in vitro*, приводящими к потере ряда важных сигнальных механизмов. В свете сказанного обращает на себя внимание тот факт, что НПК проявляли максимальную тропность в отношении опухолей нейроэпителиального происхождения и значительно уступали ГСК в активности по направлению к опухолям иного тканевого происхождения.

ГСК, несколько уступая НПК в способности мигрировать в направлении клеток злокачественных опухолей, тем не менее активно мигрировали к неопластическим клеткам. Этот факт согласуется с данными литературы, указывающими на высокую подвижность стволовых клеток костного мозга в отношении различных линий опухолевых клеток (Nakamizo et al., 2005; Кирик и др., 2013). Их миграционные возможности немногим уступают НПК и демонстрируют принципиальные различия в этой способности с дифференцированными клетками. Нельзя не отметить, что по способности привлекать ГСК сепарированные CD133<sup>+</sup>-клетки существенно превосходят другие клетки МГБ, что также является аргументом в пользу уже высказанного предположения, что в составе популяции клеток опухоли именно ОСК

обеспечивают максимальный вклад в подачу специфического сигнала, запускающего процессы миграции ГСК и клеток других типов. Следуя этой логике, можно предполагать, что онкотехнологии, основанные на создании модифицированных СК, способны обеспечить эффективное управление судьбой опухолевых стволовых клеток.

СК обладают способностью направленно мигрировать к опухолевым клеткам, но роль этого феномена в канцерогенезе МГБ практически не изучена. Идентифицировано множество хемоаттрактантов, факторов роста и других сигнальных молекул, управляющих процессами миграции и хоуминга стволовых клеток, о чем сказано ранее. Однако роль указанных выше механизмов в патогенезе глиальных опухолей головного мозга пока описана не полностью.

Как следует из эксперимента, первичным источником сигнальных молекул, привлекающих СК, являются клетки опухоли. Способность клеток МГБ продуцировать коллаген IV типа, лектины и тенасцин доказана. Продукция клетками МГБ матриксных металлопротеаз (ММП1, 2 и 9) способствует разрушению внеклеточного матрикса (ВКМ) и высвобождению фибронектина, витронектина и ряда других молекул, резко повышающих мотильность опухолевых клеток и их способность привлекать стволовые и дифференцированные клетки. Рекрутируя микроглиоциты, астроциты и эндотелиальные клетки, МГБ индуцируют продукцию металлопротеаз, что усиливает процессы деградации ВКМ. Поскольку

инвазивные свойства МГБ ассоциированы именно с ОСК, то наблюдаемая в эксперименте лучшая подвижность ГСК и НПК относительно ОСК позволяет предположить, что способность привлекать СК не только находится в зависимости от инвазивного потенциала опухоли, но и усиливается в процессе реализации этого потенциала.

Таким образом, в эксперименте *in vitro* изучены процессы направленной миграции СК к ОК различных типов. Установлено, что способность мигрировать к опухолевым клеткам в большей степени свойственна именно тканеспецифическим нейральным прогениторным клеткам. Наилучшей способностью индуцировать миграцию СК обладают ОСК, что свидетельствует о прямой зависимости этого феномена от инвазивного потенциала опухоли. Вектор миграционной активности более выражен между клетками, имеющими единый гистогенетический источник.

ГСК обладают выраженной способностью к миграции в отношении клеток глиальных опухолей. В свою очередь, клетки глиобластомы линии также обладают высокой степенью мобильности и активно перемещаются в поле зрения, «собирая» стволовые клетки. На принципиальное значение адгезии стволовых и опухолевых клеток указывали Greenbaum (2013), Pittenger (2008), Sohin (2003) и ряд других авторов, отметивших принципиальную возможность ко-лаборации между ними. При этом важно, что ГСК не являются сугубо адгезионной культурой и выявленная нами

и описанная в литературе способность СК этого типа адгезировать к клеткам злокачественных опухолей является важным условием, определяющим их роль в опухолевом процессе.

Мысли о противоопухолевых свойствах ГСК высказываются более 50 лет, однако механизмы этого явления неясны. Показана способность ГСК подавлять процессы роста клеток рака поджелудочной, предстательной желез и ряда некоторых линий меланомы, клеток первичного лейкоза, саркомы Капоши, гепатомы и рака молочной железы. В качестве механизмов этого феномена указывается подавление CD34<sup>+</sup>-клетками процессов сигнальной трансдукции по внутриклеточному пути MAPK и особая роль активации ГСК лиганд-рецепторных осей CXCR4/SDF, VLA4/VCAM1, CD62L/PSGL, CD44/HA b Kit/KL (Nervi et al., 2006) в опухолевых клетках. Высказывается мнение, что активное привлечение ГСК в опухолевый очаг, осуществляемое через активацию этих сигнальных механизмов, имеет целью трансформацию их в резидентные макрофаги с последующей презентацией опухолевых антигенов (Ratajczak et al., 2003; Sainathan et al., 2008). Как показано в литературе, адгезия ГСК к поверхности клеток опухоли (Sahin et al., 2012) снижает степень их мобильности, подавляя индуцированный TGF- $\beta$ -синтез компонентов межклеточного матрикса и препятствуя метастазированию (Xiang et al., 2015).

Важной особенностью процесса коммуникации ГСК

с клетками опухолей является перенос флуоресцентной метки между ними. В настоящей работе использовались красители на основе сукцинимидного эфира 5,6-карбоксилфлуоресцеин диацетата, обладающего липофильными свойствами, благодаря чему они легко проникают сквозь клеточную мембрану в процессе окрашивания. В цитоплазме клетки молекула красителя ковалентно взаимодействует с аминокетто-группами цитоплазматических белков (Rahman et al., 2015), благодаря чему метка не высвобождается из клеток и приобретает способность флуоресцировать. Это позволяет рассматривать сущность выявленного в настоящем фрагменте работы феномена переноса флуоресцентной метки именно как трансфер цитоплазматических белков, неразрывно связанных с клеточным красителем. При этом транспорт белков происходит преимущественно между ГСК и опухолевыми клетками разных линий, что, очевидно, представляет собой закономерность межклеточного взаимодействия в данной системе.

Особый интерес представляют механизмы данного явления. Существуют данные о возможности клеточной фузии, или слияния стволовой и неопластической клеток (Чумасов и др., 2010). Этот механизм играет важную роль в регуляции стволовыми клетками процессов детерминации, индукции и дифференциации, коррекции нарушений в поврежденных клетках, репарации и регуляции фенотипа стволовых клеток костного мозга (Wurmser et al., 2002).

Обмен флуоресцентной меткой возможен через экзосомы (Xu et al., 2015), в пользу чего свидетельствует наличие большого количества флуоресцирующих объектов мелкого размера существенно меньше диаметра ГСК. Обмен экстрацеллюлярными везикулами с белками и микроРНК возможен также через особые дифференцировки цитоплазмы – наноразмерные микротрубки (Godlewski et al., 2015), образуемые между мембранами взаимодействующих клеток, либо путем формирования структурно-функционального синцития между стволовыми и опухолевыми клетками.

В ходе эксперимента при взаимодействии стволовых и опухолевых клеток мы наблюдали ряд принципиальных моментов. Так, способность ГСК к подавлению ключевых функций опухолевых клеток носит дозозависимый характер, что в известном смысле объясняет конечный биологический смысл их миграции в опухолевую ткань. Резонно предположить, что существенная разница между количеством СК в молодом и пожилом возрасте является одной из причин преобладания злокачественных опухолей во 2-й половине жизни.

При сокультивировании ГСК и опухолевых клеток различных типов в соотношении 1:1 становится возможным описать другие принципиальные закономерности. Клетки рака легкого преимущественно накапливают флуоресцентную метку (цитоплазму), привнесенную из ГСК, что, вероятно, является одним из механизмов противоопухолевого дей-

ствия этого типа клеток. Во втором случае при культивировании ГСК с клетками линии U-87 и MCF-7 наблюдается увеличение количества дважды позитивных клеток при снижении количества ГСК. При этом важно, что к 96 ч наблюдений в сокультуре ГСК с клетками глиобластомы практически не остается стволовых клеток, позитивных только в отношении одного из используемых красителей.

Механизмы данного феномена нуждаются в дальнейшем изучении, однако, исходя из данных эксперимента, нельзя исключить, что специфика наблюдаемых феноменов отражает именно принципиальное существо взаимодействия между клетками данного типа. Так, направленная миграция ГСК к клеткам глиобластомы резко усиливается при активации различного типа рецепторов лигандами, продуцируемыми как зоной повреждения, так и самими опухолевыми клетками. В ответ на эти стимулы ГСК мигрируют к опухолевым клеткам и адгезируют к ним. Безусловно, это явление носит регуляторный характер, но в процессе взаимодействия с неопластическими клетками ГСК подвергаются воздействию различных протеолитических ферментов, продуцируемых клетками опухоли. С одной стороны, такое воздействие запускает в них процессы апоптоза, что проявляется накоплением в цитоплазме соответствующих белков, с другой – позволяет опухолевым клеткам фагоцитировать фрагменты разрушенных клеток. Весьма вероятно, что накопление в опухолевых клетках проапоптотических и других

белков вызывает серьезные сдвиги в эпигенетической регуляции экспрессии генов, что ведет к торможению пролиферации и угнетению жизненных функций опухолевых клеток. Именно при следовании этой логике становится понятным наблюдаемый нами дозозависимый противоопухолевый эффект ГСК.

Таким образом, при совместном культивировании гемопоэтические  $CD34^+$  стволовые клетки адгезируют к клеткам злокачественных опухолей, что сопровождается переносом цитоплазматического содержимого из ГСК в опухолевые клетки. Этот феномен наблюдается у 31% клеток глиомы линии С6, у 47% клеток рака легкого А549 и аденокарциномы молочной железы и у 64% клеток линии U-87 глиобластомы человека. Увеличение соотношения в системе «опухолевые клетки / ГСК» в сокультуре сопровождается замедлением темпов пролиферации опухолевых клеток.

# **Глава 5. Фундаментальные аспекты проблемы: взаимодействие гемопоэтических стволовых и опухолевых клеток на модели глиобластомы *in vivo* (соавт. д.м. н. И.С. Брюховецкий, м.н. с. С.В. Зайцев)**

Последние 10 лет наша исследовательская группа занималась серьезными фундаментальными научными исследованиями в области изучения межклеточного взаимодействия стволовых клеток (СК) и различных типов опухолевых клеток (ОК) и опухолевых СК (ОСК) не только *in vitro*, но и *in vivo* (Брюховецкий А. С., 2003—2016; Брюховецкий И. С. и др., 2010—2016; Bryukhovetskiy A.S. et al., 2013—2016; Bryukhovetskiy I.S. et al., 2010—2016). Работа была выполнена как на частные пожертвования, так и при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашения №14.575.21.0038 (RFMEF157514X0038), 14.584.21.0027 (RFMEF158417X0027)), Российского научного фонда (проект №14-15-00084), Российского фонда

фундаментальных исследований (проект №19-315-90077). В соответствии с поставленной задачей исследование включало 3 этапа работ:

- 1) моделирование глиобластомы *in vivo*;
- 2) изучение феномена направленной миграции гемопоэтических стволовых клеток в опухолевый очаг;
- 3) изучение закономерностей процесса межклеточного взаимодействия в опухолевом очаге.

*Создание экспериментальной модели глиобластомы in vivo*

Прежде чем приступить к непосредственному описанию экспериментов, считаем необходимым сделать важную ремарку по поводу дизайна работы. Абсолютное большинство работ по изучению взаимодействия и взаимовлияния нормальных стволовых и опухолевых клеток *in vivo* выполнены с использованием особого типа экспериментальных животных, а именно иммунодефицитных крыс и мышей. Признавая методологическую обоснованность таких исследований, не можем не подчеркнуть, что разрыв между научной значимостью и практической ценностью таких данных весьма велик. В этой связи при планировании эксперимента мы отказались от использования иммунодефицитных животных, выбрав в качестве объекта исследования половозрелых крыс породы вистар возрастом 10—12 нед., массой 200—220 г.

Использование одобрено Этическим комитетом Школы биомедицины ДВФУ (протоколы №1 и 2 от 05.03.2017). Животных содержали в условиях, соответствующих стандартам GLP и Хельсинкской декларации WMA об этических принципах лечения животных в экспериментах. Исследование проводилось в соответствии с требованиями законодательства Великобритании (U.K. Animals Scientific Procedures), Директивой ЕС 2010/63/EU для экспериментов на животных и руководством Национального института здравоохранения США по уходу и использованию лабораторных животных. Все исследования на животных соответствовали рекомендациям ARRIVE и рекомендациям AVMA 2013 г. по эвтаназии экспериментальных животных.

Для моделирования низкодифференцированной злокачественной опухоли головного мозга использованы клетки глиомы линии C6 (ATCC® CCL-107). Клетки использованы в эксперименте после 3-го пассажа с момента разморозки. Перед началом эксперимента все клетки протестированы на контаминацию микоплазмой с помощью Universal Mycoplasma Detection Kit (ATCC® 30—1012K™). Для определения фенотипа опухолевых клеток выполняли предварительную иммуноцитохимическую характеристику. Антителами к нестину окрашивались  $87,6 \pm 12,1\%$  клеток, к белку p53 –  $82,3 \pm 9,8\%$ . Число клеток линии C6, позитивных в отношении к белкам CD133 ( $3,7 \pm 2,8$ ), S100 ( $7,4 \pm 4,3\%$ ), глиального фибриллярного кислого белка

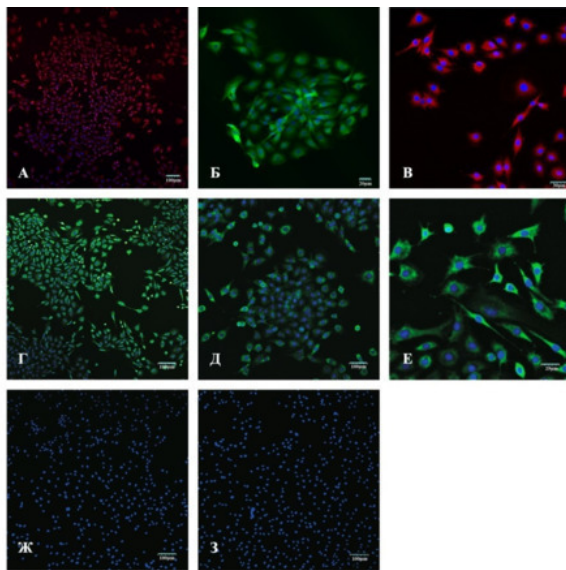
GFAP ( $7,2 \pm 2,2\%$ ) и  $\beta$ III-тубулина ( $9,3 \pm 4,4\%$ ), было невелико (рис. 22).

Животных анестезировали внутрибрюшинной инъекцией 2 мг раствора, содержащего Zoletil 100 (Virbac, Франция) + Rometar (Bioveta a.s. Czech) в соотношении 1:4. Выполняли разрез кожи головы и накладывали фрезевое отверстие, используя Ideal Micro Drill (Harvard apparatus, US);  $0,2 \times 10^6$  клеток глиомы вводили в 5  $\mu$ л стерильного 0,14 М раствора NaCl со скоростью 1  $\mu$ л/м, используя гамильтоновский шприц (600 Series, Hamilton, US). Имплантацию выполняли, используя стереотаксический аппарат для крыс SR-5R-HT (Narishige, Japan), ориентируясь по координатам атласа мозга крысы (Paxinos, Watson, 2007): Ap – 1; L – 3,0; V – 4,5; TBS – 2,4 мм. Верификацию опухоли выполняли на 14-й день, используя магнитно-резонансный томограф Bruker's PharmaScan® (Massachusetts, US).

Имплантация опухолевых клеток в мозг половозрелых крыс породы вистар приводила к быстрому формированию опухолей, хорошо визуализируемых при МРТ-обследовании головного мозга, у оперированных животных спустя 7 сут. с момента имплантации (рис. 23). К 20-му дню эксперимента опухоль была хорошо заметна на препаратах головного мозга крыс. При анализе морфологических изменений обращали на себя внимание гиперемия сосудов мозга в месте расположения опухоли, набухание и отечность мозгового вещества, наличие на поверхности мозга рельефных вдавлений от ко-

стей черепа, сглаженность основных борозд и извилин.

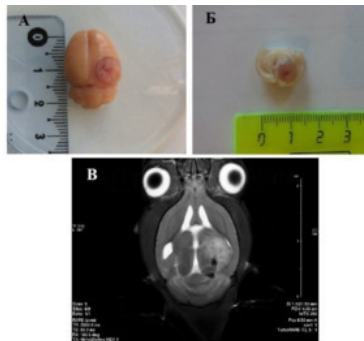
Как правило, опухоль занимала больше половины полушария мозга, возвышалась над его конвекситальной поверхностью и была представлена на срезах мозга светло-красной или пестрой опалесцирующей тканью, контрастной цвету основных церебральных структур (рис. 24 А—В).



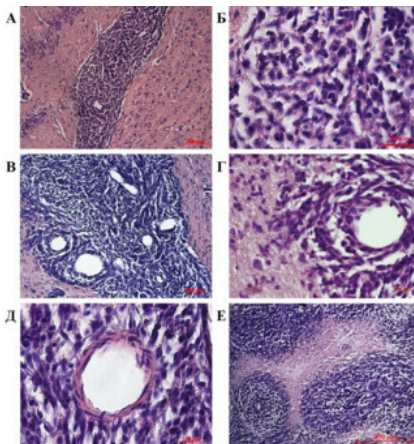
**Рис. 22.** Иммуноцитохимическая характеристика клеток линии С6, использованных для экспериментального моделирования глиобластомы *in vivo*. Иммуногистохимическая реакция: А – на нестин, Б – p53; В – CD133; Г – tubulin- $\beta$ III; Д – S100, Е – GFAP. Ж, З – контрольное окрашивание вторич-

ными антителами: Ж – Alexa 488; З – Alexa 633. Специфическая флуоресценция отсутствует. Ядра докрашены DAPI

При гистологическом исследовании неопластическая ткань была представлена клетками разнообразной формы с различным количеством ядер (рис. 24 А, Б).



**Рис. 23.** #Опухоль в мозге крысы, 20 сут. после введения клеток. А – макропрепарат, опухоль возвышается над поверхностью полушария; Б – фронтальный срез головного мозга, признаки сдавления опухолью мозговых структур; В – магнитно-резонансная томограмма мозга крысы, 20 сут. эксперимента, режим N2 Turbo RARE



**Рис. 24.** #Опухоль в головном мозге крыс. *А, Б* – 14 сут. с момента имплантации (*Б* – масштаб 200 мкм); *В, Г* – 20 сут., опухолевая ткань с новообразованными кровеносными сосудами; *Д* – формирование кровеносного сосуда среди клеток сателлитного очага; *Е* – 30 сут., ангиоцентрическая группировка опухолевых клеток и зоны некроза в опухолевой ткани. Окраска гематоксилин-эозином

К 14-му дню опухоль содержала множество микрососудов, что свидетельствовало о высокой скорости метаболических процессов. Очевидно, хорошая васкуляризация интенсифицировала метаболизм клеток глиомы, которые, формируя вихревые очертания вокруг новообразованных сосудов, вторгались в дистрофически измененную паренхиму мозга, где формировали длинные клеточные тяжи, окру-

женные большим количеством солитарных клеток глиомы, инфильтрирующих мозговое вещество. На некотором удалении от первичного неопластического узла клетки глиомы уплотнялись и образовывали конгломераты, из которых возникали сателлитные очаги. В центре такого очага быстро формировался питающий кровеносный сосуд, что значительно интенсифицировало процессы неопластического роста и инвазии. С появлением в кровеносном сосуде признаков эластической мембраны обнаруживалась тенденция к слиянию сателлитного очага с первичной опухолью. При этом клетки опухоли уплотнялись вокруг кровеносного сосуда, что формировало характерную картину «псевдорозеол» (5 E).

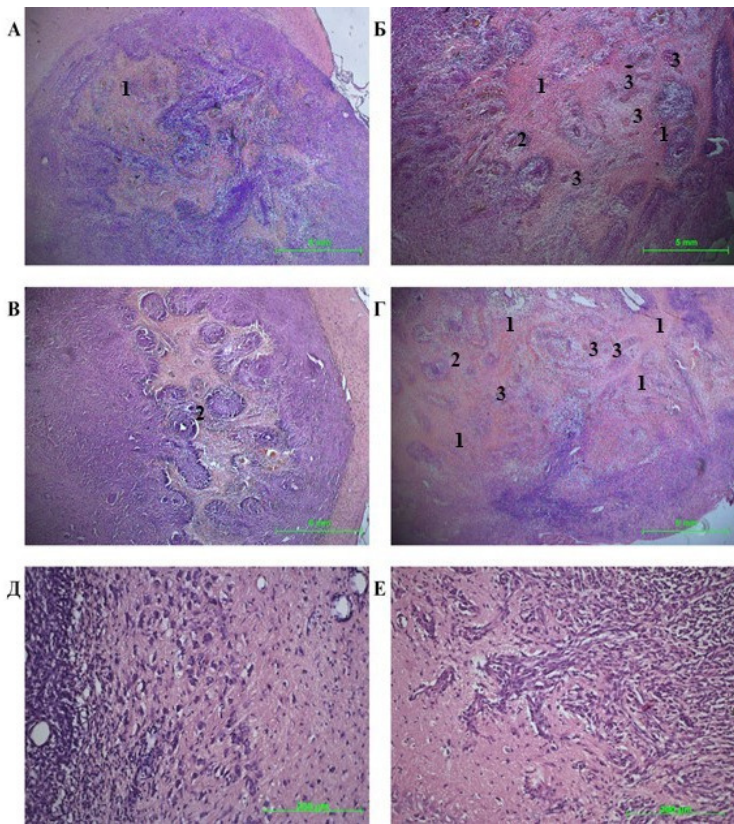
С 28-го дня наблюдения в глубоких отделах опухолевой ткани начинались процессы гибели неопластических клеток, что указывало на принципиальную неспособность кровеносной сети обеспечить потребности быстро растущей клеточной массы опухоли. С этого времени в опухолевой ткани появлялись зоны разрежения, большая часть опухолевых клеток концентрировалась вокруг питающего кровеносного сосуда, обнаруживая характерную картину розеол или «псевдорозеол» на фоне участков некроза, занимающих основное место в морфологической картине, окруженных псевдопалисадными структурами (рис. 25).

Таким образом, имплантация  $0,2 \times 10^6$  клеток глиомы линии С6 данного иммунофенотипа быстро приводила к фор-

мированию опухоли, обладающей инвазивным ростом, высокими темпами пролиферации опухолевых клеток, ангиогенезом и формированием некрозов, что, наряду с неизоморфностью образующих ее клеточных элементов, позволяет считать ее аналогом МГБ человека.

*Анализ миграции гемопоэтических стволовых клеток в опухолевый очаг*

Для решения конкретной задачи, а именно изучения закономерностей миграции нормальных ГСК в неопластический очаг, был использован биомедицинский препарат гемопоэтических стволовых клеток, предоставленный АО Клинический госпиталь «НейроВита» (г. Москва). По данным сопроводительной документации, препарат был представлен лейкоконцентратом моноклеарных CD45<sup>+</sup>-клеток красного костного мозга, рекрутированных в системный кровоток после стимуляции больных гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (Г-КСФ). Число клеток иммунофенотипа CD34<sup>+</sup> в составе лейкоконцентрата варьировало от 2,5 до 4,5%. Ксенотрансплантация согласована с Этическим комитетом Школы биомедицины ДВФУ (протокол №2 от 05.03.2017).



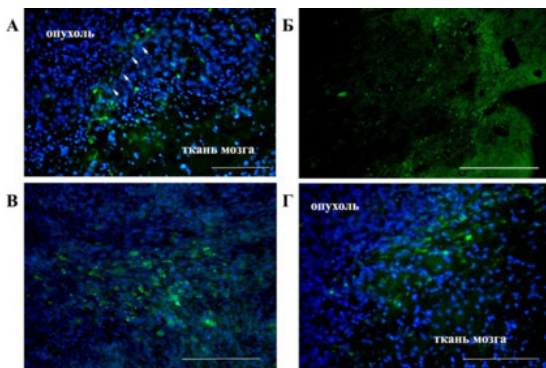
**Рис. 25.** Микропрепарат мозга крысы с перевитой глиомой С6. Окраска гематоксилин-эозином, 28 сут. эксперимента. А—Г – некротические области в центре опухолевого узла (1), новообразованные кровеносные сосуды в окружении плотно сгруппированных опухолевых клеток, формиру-

ющих псевдопалисадные структуры (2), а также множество запустевших новообразованных кровеносных сосудов в центре некротических областей (3); *D* – множественные неопластические клетки, инфильтрирующие ткань мозга; *E* – участки инвазии по типу «языков пламени»

На протяжении 1 нед. перед проведением эксперимента животным была проведена иммуносупрессивная терапия (бусульфан Sigma-Aldrich, кат. № ВР403), дексаметазон (Sigma-Aldrich, кат. № D1159), циклофосфамид (Sigma-Aldrich, кат. № ВР1094)). За 2 ч до введения животным ГСК были окрашены флуоресцентными трейсерами Red CMTPX Dye (С34552, Molecular Probes; спектр возбуждения / эмиссии 577/602 нм) или Vybrant® CFDA SE (V12883, Molecular Probes; спектр возбуждения / эмиссии 492/517 нм) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Эти клетки в количестве  $0,5 \times 10^6$  вводили в системный кровоток крыс через центральную хвостовую вену в условиях общей анестезии. Животных выводили из эксперимента на 3, 5, 8 и 15 сут. после введения клеток. Контролем служили крысы, получавшие инфузию меченных данными маркерами ГСК, но без предшествующей имплантации опухолевых клеток.

У животных экспериментальной группы появление единичных флуоресцирующих объектов в зоне расположения опухолевой ткани наблюдалось уже через 3 дня после введения клеток. В этот период местом их предпочтительной

локализации является граница между опухолью и здоровой тканью мозга. Появление флуоресцирующих объектов в более глубоких зонах опухоли регистрируется в связи с проходящими здесь кровеносными сосудами (рис. 26 А, указано стрелками).

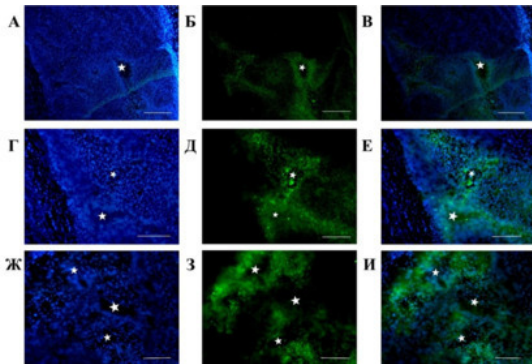


**Рис. 26.** #Распределение меченных Vybrant® CFDA SE гемопоэтических стволовых клеток в мозге животных с привитой глиобластомой на 3-е (А) и 5-е (Б—Г) сутки после введения. А – на ранних сроках клетки локализуются вдоль границы опухоли или проникают вглубь неопластической ткани по ходу кровеносных сосудов (указаны стрелками); Б – плотное скопление флуоресцирующих клеток на 5-й день после инфузии. ГСК с сохранной морфологией группируются в глубине опухоли среди ее клеток (В) или на границе с интактной тканью мозга (Г). Ядра докрашены DAPI. Масштаб 200 мкм.

На 5 сут. с момента введения ГСК число флуоресцирующих клеток в зоне расположения опухоли заметно возрастает (рис. 26 Б). В этот период они формируют плотное скопление по периферии неопластического очага (рис. 26 Г), в виде небольших группировок обнаруживаясь в глубине опухолевой ткани (рис. 26 В). Как и на более ранних сроках наблюдения, они локализуются в непосредственной близости от кровеносных сосудов. Клетки, содержащие краситель, в этот период сохраняют четкие очертания перикарионов, гранулы флуорохрома распределены равномерно по их цитоплазме, оставляя свободной от окрашивания зону ядра (рис. 26 В, Г).

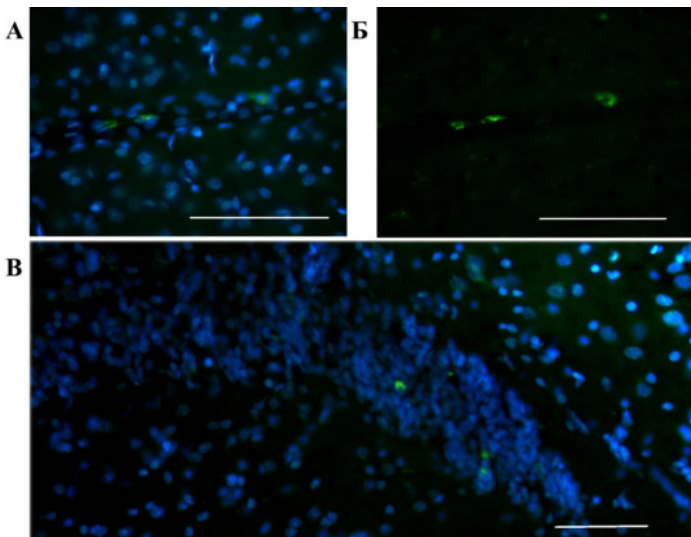
В течение 8—15 сут. (рис. 27) продолжается дальнейшая инфильтрация опухолевой ткани мечеными ГСК с параллельным уменьшением их количества в краевой зоне опухоли. В этот период начинают регистрироваться признаки разрушения введенных клеток – флуоресцентный сигнал распределяется не только в цитоплазме, но и в межклеточном пространстве. На 8 сут. после инфузии ГСК суммарная площадь флуоресцирующих объектов на границе опухолевого узла ( $12,7 \pm 9,2\%$ ) уступала таковой в паренхиме опухолевой ткани ( $47,6 \pm 9,3\%$ ). Через 15 дней диффузный флуоресцентный сигнал регистрируется вдоль границ опухоли, которые к этому моменту имеют размытые очертания. Наибольшая интенсивность метки сохраняется в глубоких отделах опухоли, где регистрируются отдельные клеточные элемен-

ты, конгломераты клеток, а также большие зоны перичеллюлярного скопления флуоресцирующего материала. Обращает на себя внимание тот факт, что на поздних сроках наблюдения флуоресцентная метка доминирует на границе зон клеточного разряжения опухолевой ткани – зон некроза (рис. 27, отмечены звездочками).



**Рис. 27.** #Распределение меченных Vybrant® CFDA SE гемопоэтических стволовых клеток в мозге животных с привитой глиобластомой на 8-е (А—Е) и 15-е (Ж—И) сутки после введения. Клетки локализуются преимущественно в глубине опухолевой ткани вокруг зон некроза (обозначены звездочками). Флуоресцентная метка, особенно на поздних сроках наблюдения (Ж—И), распределена как в цитоплазме клеток, так и между ними. А, Г, Ж – DAPI; Б, Д, З – флуоресцентный сигнал CFDA SE; В, Е, И – объединенный сигнал. Масштаб – 500 мкм.

В головном мозге животных группы сравнения (введение ГСК без предварительного формирования опухоли) распределение введенных клеток носило иной характер. В первые 3—5 сут. после трансплантации ГСК у крыс контрольной группы обнаружены солитарные флуоресцирующие объекты, соответствующие установленному диапазону свечения CFDA SE-позитивных ГСК. Клетки локализируются внутри кровеносных сосудов, в паренхиме мозга в непосредственной близости от них и в небольшом количестве встречаются в составе сосудистых сплетений мозговых желудочков (рис. 28).

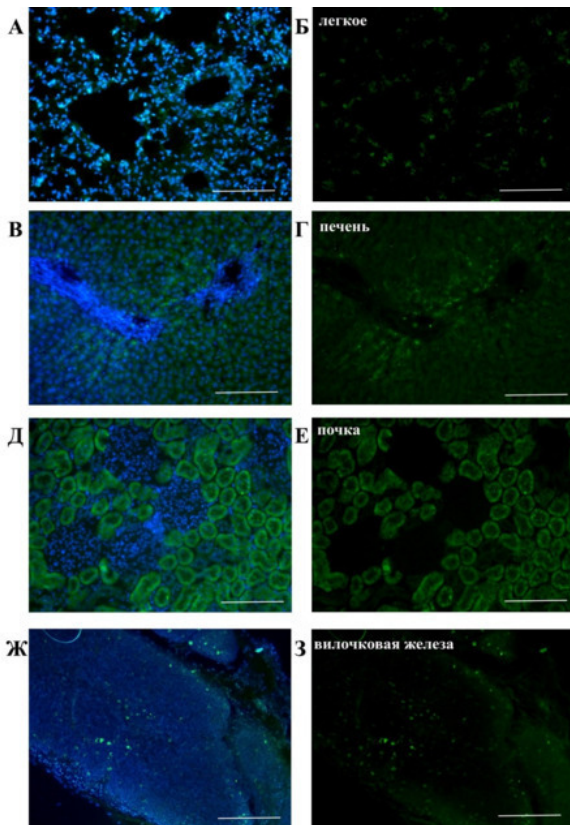


**Рис. 28.** #Распределение трансплантированных ГСК в мозге животных без опухоли. Единичные клетки визуализируются в просвете кровеносного сосуда (А, Б) и в сосудистом сплетении мозговых желудочков (В). Окраска Vibrant CFDA SE;  $\lambda = 488$  нм, Ex/Em = 492 / 517 нм. Ядра окрашены DAPI. Флуоресценция трансплантированных клеток контрастна аутоосвечению мозговой ткани. Масштаб 100 мкм.

На 8—15 сут. эксперимента на препаратах мозга крыс контрольной группы объекты, соответствующие форме и размеру ГСК и флуоресцирующие длине волн, соответствующих зеленому спектру (CFDA SE 492/517), не обнару-

живались.

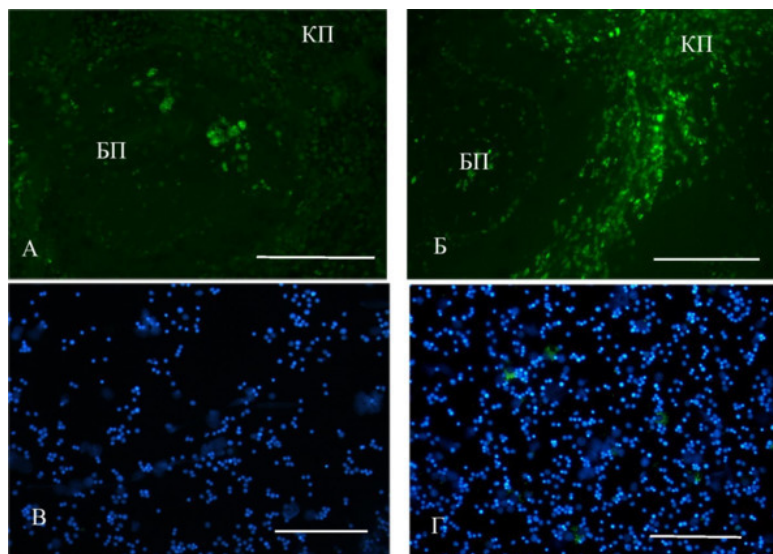
В паренхиматозных органах (легкие, печень, почки, вилочковая железа) животных контрольной и экспериментальной групп в течение 3—5 сут. после введения обнаруживаются единичные флуоресцирующие клетки, достаточно сложно дифференцируемые от интенсивной аутофлуоресценции исследуемых органов (рис. 29).



**Рис. 29.** Ткани паренхиматозных органов крыс контрольной группы (без глиомы С6), получивших трансплантацию гаплоидентичных гемопоэтических ( $CD34^+$ ) стволовых клеток. Окраска CFDA SE, мультифотонная флуоресцентная лазерная микроскопия ( $\lambda = 488$  нм). А, Б – легкие; В, Г – пе-

чень; Д, Е – почки; Ж, З – вилочковая железа. А, В, Д, Ж – ядра клеток докрашены DAPI. Масштаб 100 мкм.

Следует отметить, что в селезенке животных обеих групп в течение первых 3—5 сут. после введения наблюдается повышение содержания флуоресцирующих клеток в области красной пульпы (Рис. 30Б). В этот же период солитарные флуоресцирующие объекты обнаруживаются в красном костном мозге животных, получавших гемотрансфузию ГСК (рис. 30 В, Г).



**Рис. 30.** Транзиторное повышение числа флуоресцирую-

щих клеток в красной пульпе селезенки (*Б*) и в красном костном мозге (*Г*) на 3 сут. после введения ГСК, меченных CFDA SE. *А* – аутофлуоресценция в белой пульпе селезенки интактных животных; *Б* – отсутствие специфического сигнала в красном костном мозге интактных животных. Обозначения: *КП* – красная пульпа; *БП* – белая пульпа. *В*, *Г* – ядра докрашены DAPI. Масштаб 100 мкм.

При изучении процесса миграции ГСК с использованием красителя Red CMTPX Dye получены идентичные данные. Однако в отличие от клеток, окрашенных CFDA SE, сохраняющих активное свечение в течение 2 нед. после активации в клетках, краситель Red CMTPX Dye сохраняет свою флуоресценцию в течение первых 3—5 дней.

Таким образом, гемопоэтические стволовые клетки, трансплантированные в организм экспериментальных животных с глиомой С6, направленно мигрируют в опухоль, где первоначально (3—5 сут.) накапливаются на границе неопластического очага и на последующих этапах (8—15 сут.) проникают в ткань глиомы и сосредотачиваются в участках некроза опухоли. Закономерностью этого процесса является накопление трансплантированных ГСК непосредственно в опухолевой ткани ( $47,6 \pm 9,3\%$ ) и зонах инвазивного роста опухоли ( $12,7 \pm 9,2\%$ ). При введении в организм крыс без опухоли ГСК не имеют конечной цели миграции, остаются в пределах капиллярного русла мозга и мозго-

вых желудочков, что является существенной особенностью данного процесса. Трансплантированные клетки практически не обнаруживаются в паренхиматозных органах (легкие, печень, почка, вилочковая железа), а транзитное повышение их количества в селезенке может свидетельствовать об их разрушении в красной пульпе при введении в системный кровоток.

*Взаимодействие гемопоэтических стволовых клеток с клетками глиомы С6 в опухолевом очаге*

Целью данного этапа работ являлось изучение закономерностей и механизмов воздействия ГСК на течение опухолевого процесса в мозге *in vivo*. Поскольку в работах, описанных выше, была использована ксенотрансплантация клеток костного мозга человека в организм крыс с глиомой С6, получивших предварительную иммуносупрессивную терапию, то для изучения закономерностей взаимодействия ГСК с клетками глиобластомы *in vivo* мы отказались от этой модели.

Одним из ведущих способов получения клеток костного мозга для использования в онкологической практике является рекрутирование гемопоэтических стволовых клеток в системный кровоток путем стимуляции гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (Г-КСФ), с последующим сбором лейкоконцентрата мононуклеарных CD45<sup>+</sup>-клеток,

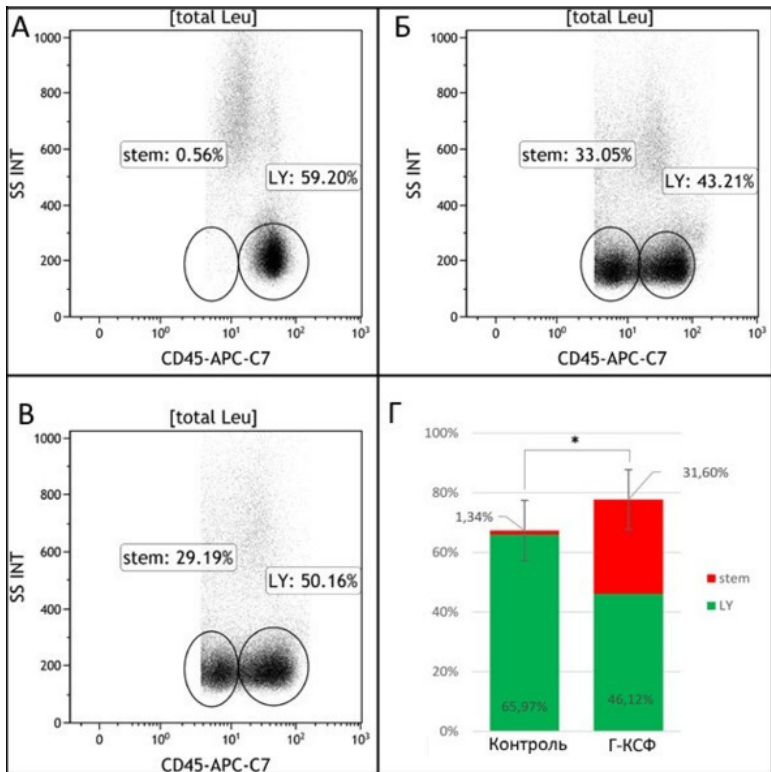
содержащих значительное количество CD34<sup>+</sup> ГСК. В этой связи план работ включал 2 принципиально значимых этапа: 1) иммобилизация аутологических ГСК в системный кровоток экспериментального животного с глиомой С6; 2) характеристика иммуногистохимических трансформаций опухолевого узла в мозге крыс с рекрутированными в системный кровоток ГСК.

### *Рекрутирование ГСК в системный кровоток экспериментального животного с глиомой С6*

Животным вводили подкожно Г-КСФ (Filgrastim, кат. № YY0101173 Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США), 4 мг/день, в течение 7 дней. Иммобилизацию мононуклеарных CD45<sup>+</sup>-клеток проверяли путем анализа крови экспериментальных животных с помощью проточного цитометра Navios™ (Beckman Coulter, США). В исследовании использовали антитела против крысиного CD45 (OX-1, конъюгированный с APC / Cy7, кат. №202216, Biolegend Inc., США). Данные цитофлуориметрии обрабатывали с помощью Navios Software v. 1.2 и Kaluza™ v. 1.2 (Beckman Coulter, США).

По данным проточной цитометрии, стимуляция животных Г-КСФ сопровождалась значительным увеличением числа CD45<sup>+</sup> мононуклеарных клеток в периферической крови экспериментальных животных с глиомой С6 (рис. 31),

при этом количество клеток CD45<sup>+</sup>, экспрессирующих основной маркер ГСК – мембранный антиген, – возросло до  $30,0 \pm 1,3\%$ , что указывает на исключительно сильное иммуномобилизирующее действие Г-КСФ. Важно, что мы не нашли коммерческих наборов для идентификации CD34<sup>+</sup>-клеток крысы, однако «боковая популяция» ГСК-подобных клеток идентифицирована по методу Telford (2010).



**Рис. 31.** #Результаты цитометрического анализа образцов крови экспериментальных животных с глиомой С6, получивших стимуляцию Г-КСФ. А – доля  $CD45^+$ -клеток в общем количестве лимфоцитов. При этом красным маркером выделено количество ГСК-подобных клеток в общем числе  $CD45^+$  мононуклеарных клеток; Б, В – результаты цитомет-

рического анализа популяции CD45<sup>+</sup>-клеток, «боковая популяция» ГСК подобных клеток идентифицирована по методу Telford (2010)

*Характеристика иммуногистохимических трансформаций опухолевого узла в мозге крыс с рекрутированными в системный кровоток ГСК*

В данном фрагменте работы методами иммуногистохимии выявлялись особенности распределения маркеров пролиферации, стволовости, астро- и микроглии, а также некоторых сигнальных молекул в мозге животных с привитой опухолью (контрольная группа) и после иммобилизации ГСК (группа «клетки»).

*Контрольная группа*

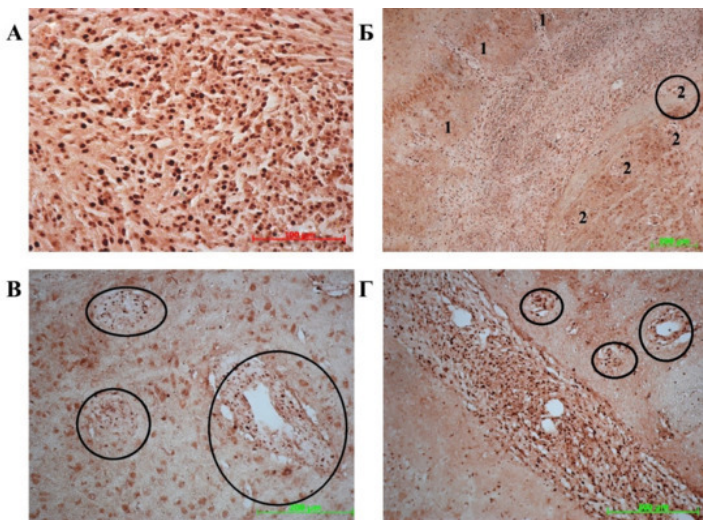
Средняя продолжительность жизни контрольных животных составила  $27,2 \pm 5,8$  дня. Средний объем опухолевого узла в головном мозге составил  $202,1 \pm 19$  мм<sup>3</sup>. Для животных этой группы были характерны очень быстрое нарастание неврологических симптомов, снижение и полное исчезновение рефлексов на сгибание и переворачивание, появление одностороннего птоза на стороне опухоли с последующим присоединением признаков застоя на глазном дне, дискоординация между правыми и левыми лапами, появление

манежных движений. По мере роста опухоли крысы становились вялыми, неохотно пили воду и отказывались от еды с последующим развитием комы и судорожных симптомов. При морфологическом исследовании тканей мозга выявлялась типичная морфологическая картина, детально описанная ранее.

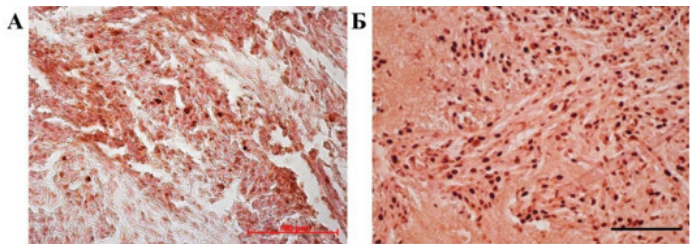
При иммуногистохимическом окрашивании антителами к ядерному белку пролиферирующих клеток (PCNA) выявлялось резкое возрастание темпов пролиферации в ткани опухоли с 10-го по 20-й дни наблюдения, что, очевидно, связано с интенсификацией процессов деления опухолевых клеток в связи с формированием неопластической кровеносной сети. Вне опухолевого очага максимальное количество PCNA-позитивных клеток было сосредоточено в прилегающих тканях, зонах лучеобразной инвазии клеток глиомы в ткань мозга и кровеносных сосудах разного калибра (рис. 32 А—Г).

С 20-го по 30-й дни исследования количество пролиферирующих клеток в опухолевой ткани уменьшалось. К этому времени в опухолевой ткани появлялись обширные зоны запустения, некроза (рис. 33 А), а PCNA-позитивные клетки начинали уплотняться, обнаруживали отчетливую тенденцию к смещению к границам опухоли, где процессы пролиферации протекали особенно интенсивно (рис. 33 Б) и сочетались с активной миграцией иммунопозитивных клеток в прилегающие ткани мозга. Отдельные пролиферирующие

клетки встречались в ткани мозга на значительном удалении от очага.

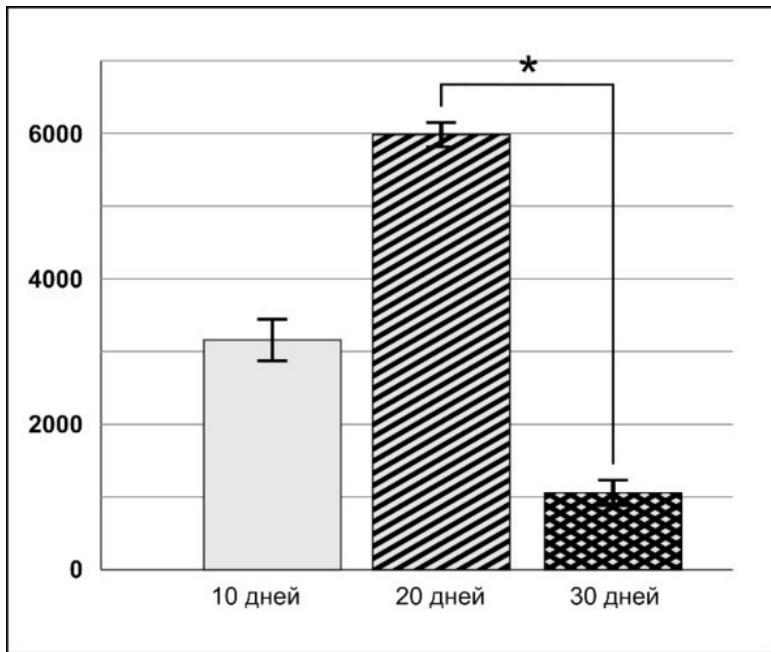


**Рис. 32.** Иммуногистохимическая реакция на антитела к PCNA. Опухолевый очаг, 20 сут. с начала эксперимента. *А* – центр опухоли, видны скопления многочисленных PCNA-позитивных элементов; *Б* – прилежащее у опухоли вещество мозга: *1* – зоны инвазии PCNA<sup>+</sup>-клеток в ткань мозга, в сочетании с инфильтрацией ими окружающей ткани мозга (*2*); *В*, *Г* – скопление клеток PCNA<sup>+</sup> в стенке и по периферии кровеносных сосудов, обведено эллипсом



**Рис. 33.** Иммуногистохимическая реакция на антитела к PCNA через 30 сут. развития опухоли. *А* – центральная часть опухолевого очага; *Б* – граница опухоли с интактной тканью мозга. Заметно значительное увеличение количества PCNA-иммунореактивных клеток (ИР) в зонах инвазии опухоли. Масштаб 200 мкм

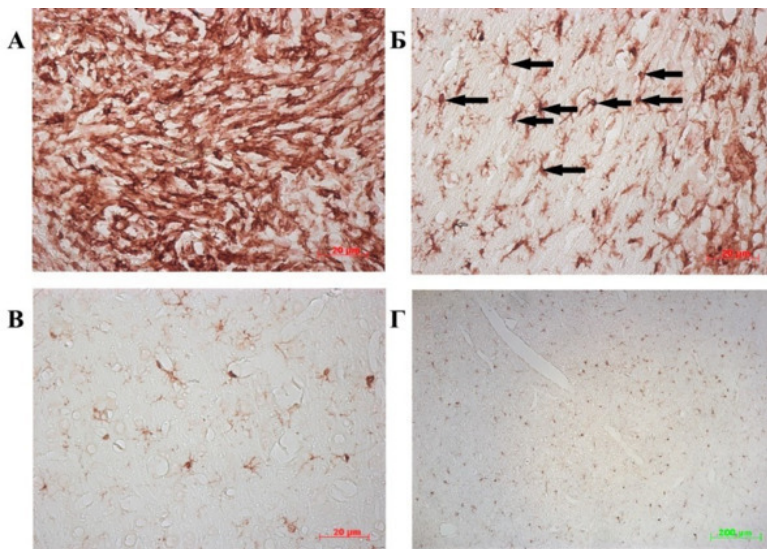
Динамика числа PCNA-позитивных клеток на различных сроках развития опухоли в контрольной группе представлена на рис. 34.



**Рис. 34.** #Динамика числа PCNA-IP в ткани глиомы S6 у крыс контрольной группы. По оси ординат – количество IP-клеток в поле зрения микропрепаратов. Данные представлены в виде  $M \pm s.e.m.$ ,  $n = 30$  для каждой группы. Знаком \* указаны достоверные ( $p < 0,05$ ) отличия количества PCNA-IP клеток между 20 и 30 сут. эксперимента

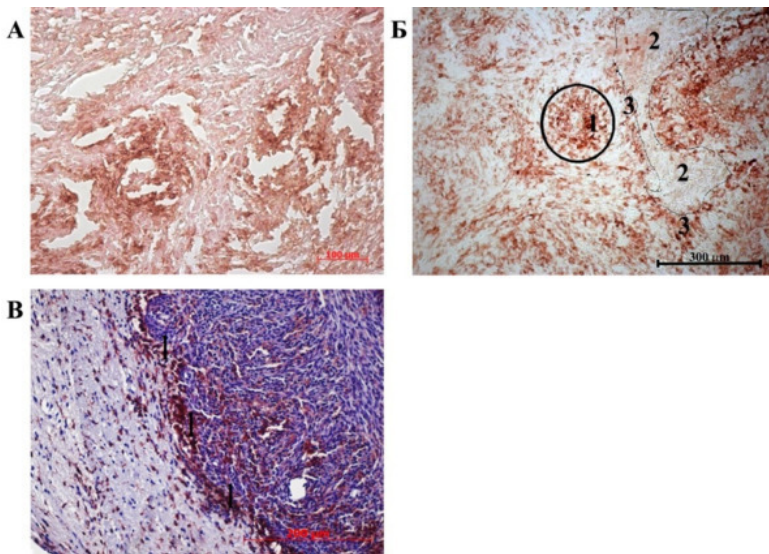
Максимальное скопление микроглиальных клеток регистрировалось с 10-го по 20-й дни наблюдения непосредственно в опухолевой ткани и в прилегающих участках ин-

вазии неопластических клеток в вещество мозга. Значительные скопления небольших IBA1-позитивных клеток с телом вытянутой формы и короткими отростками были сосредоточены в паренхиме мозга на некотором расстоянии от опухоли в области гипертрофированных кровеносных сосудов. Очевидно, скопление микроглиальных клеток в неопластическом очаге с 10-го по 20-й день эксперимента вызвано их миграцией из кровеносных сосудов и окружающих тканей мозга. Число IBA1-позитивных клеток в паренхиме мозга на стороне расположения опухоли существенно превосходило их количество в тканях интактного полушария (рис. 35).



**Рис. 35.** #Распределение микроглии в мозге животных контрольной группы на 15—20 сут. развития опухоли. Иммуногистохимическая реакция на антитела к специфическому белку микроглии (макрофагов; IBA1), 15 сут. с момента начала эксперимента. *А* – центр; *Б* – ткань мозга, непосредственно прилегающая к опухоли; видны клетки активированной микроглии с телами амебоидной формы и короткими отростками (указаны стрелками); *В*, *Г* – ткань противоположного опухоли головного мозга на 15-е (*В*) и 20-е (*Г*) сутки. Видны единичные IBA1-позитивные клетки

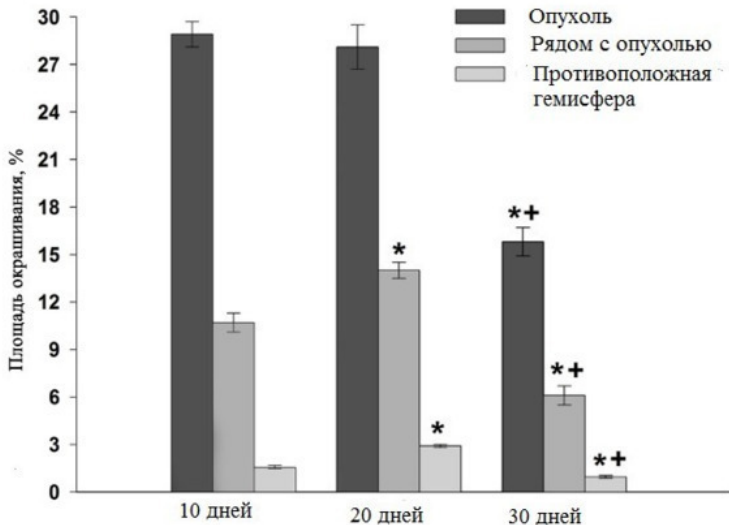
С 20-го по 30-й дни количество микроглиальных клеток в области опухолевого узла уменьшалось. В центре опухоли микроглиоциты уплотнялись, смещаясь к периферии, за счет чего зоны разрежения чередовались с участками скопления IBA1-позитивных клеток, как правило окружающих кровеносные микрососуды. В участках перивазального скопления микроглиоциты округлой и амебоидной формы формировали плотные ряды, окружающие зоны некроза. Значительное количество микроглиоцитов было локализовано вдоль границ опухолевого очага (рис. 36 *А—В*).



**Рис. 36.** #Распределение IBA1-ИР клеток в мозге животных контрольной группы на 25—30 сут. развития опухоли. *А* — неоднородное распределение IBA1-ИР микроглиоцитов в очагах некроза и участках активного роста опухоли; *Б* — концентрация IBA1-ИР вокруг кровеносного сосуда (обведены в круг) и зоны запустения (обведены маркерным карандашом), окруженные псевдопалисадными структурами (3); *В* — граница неопластического очага в мозге крыс контрольной группы. IBA1-ИР клетки образуют плотную кайму (1) на границе неопластического очага. 30-й день эксперимента. Дополнительная окраска гематоксилин-эозином

При этом значительно возросло количество клеток микроглии за пределами опухолевого очага и локализующихся в противоположной гемисфере, что, очевидно, связано с миграцией этих клеток в опухолевый очаг.

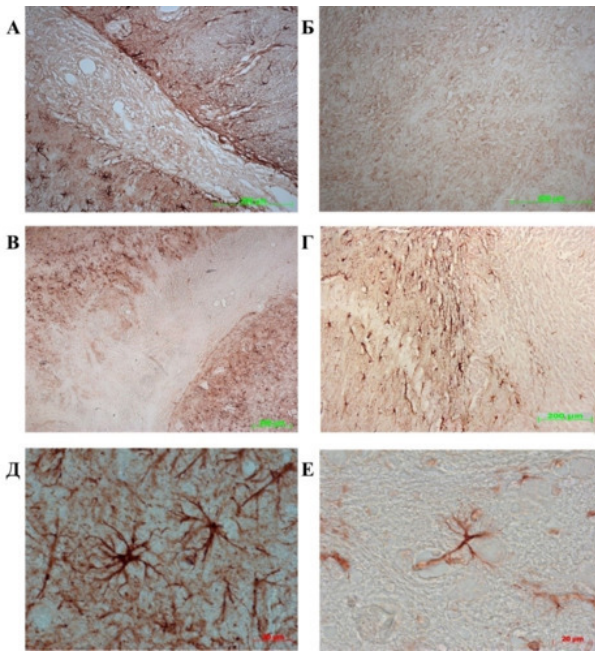
К 30 сут. микроглиальные клетки практически не обнаруживались в ткани опухолевого узла и были сосредоточены в виде плотной каймы на границе опухоли с тканью мозга (рис. 36 В). Следуя за клетками глиомы, инфильтрирующими ткань мозга, основная масса микроглии локализовалась в дистрофически измененной паренхиме, окружающей опухолевый очаг. Очевидно, подобная картина обусловлена сложными, специфическими взаимоотношениями микроглии с опухолевыми клетками, в т.ч. с ОСК, что связано с секрецией опухолевыми клетками и микроглией цитокинов, поскольку секреторная функция микроглии в данном случае имеет решающее значение. Динамика числа IBA1-позитивных клеток на различных сроках развития опухоли в контрольной группе представлена на рис. 37.



**Рис. 37.** #Динамика числа IBA1-иммунореактивных (ИР) клеток в ткани глиомы С6 у крыс контрольной группы в ходе эксперимента. По оси ординат – количество ИР клеток в поле зрения. Данные представлены в виде  $M \pm s.e.m.$ ,  $n = 30$  для каждой группы. Знаком \* указаны достоверные ( $p < 0,05$ ) отличия количества IBA1-ИР клеток рядом с опухолью и в тканях противоположной гемисферы, знаком \*+ – различие в количестве IBA1-ИР клеток по всем точкам эксперимента между 20 и 30 сут.

На 20-е сут. эксперимента у крыс контрольной группы

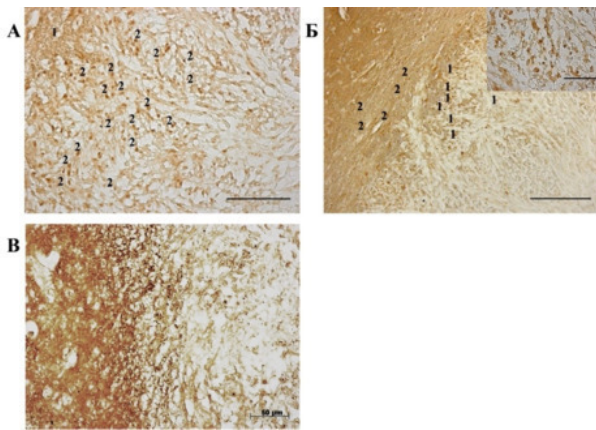
GFAP-позитивные звездчатые клетки концентрировались вокруг опухолевого очага, образуя контур, конгруэнтный зоне опухолевой инвазии (рис. 38 А), и практически не обнаруживались в неопластической ткани (рис. 38 Б). Подобная морфологическая картина сохранялась к 30 сут., однако группировка GFAP-позитивных астроцитов становилась более плотной и компактной (рис. 38 В, Г). GFAP-ИР клетки окружали зону инвазии и отсутствовали в опухолевой ткани. При более предметном морфологическом исследовании тканей мозга крыс контрольной группы GFAP-ИР клетки с телом звездчатой формы с активно ветвящимися отростками образовывали скопления вдоль опухолевого очага и, очевидно, контактировали друг с другом (рис. 38 Д, Е), формируя барьер, противодействующий инвазивному процессу. При этом в ткани мозга противоположного полушария были обнаружены только единичные GFAP-позитивные клетки. При анализе рис. 36 и 38 становится очевидным, что, двигаясь навстречу друг другу, микро- и макроглия стремится отграничить зону инвазии с двух сторон, что проявляется не только в виде локальных перестроек непосредственно на границе опухоли, но и в ткани мозга в целом.



**Рис. 38.** Иммуноцитохимическая реакция на антитела к GFAP у крыс контрольной группы. *А* – край опухоли в мозге контрольных крыс, 20 сут.; *Б* – ткань опухоли в мозге контрольных животных, 20 сут.; *В* – опухоль в мозге крыс контрольной группы, 30 сут.; *Г* – край опухолевого очага в мозге крыс группы контрольной группы, 30 сут.; *Д* – скопление GFAP-ИР клеток рядом с опухолью, 30 сут.; *Е* – единичные GFAP-ИР клетки в мозге контрольных крыс в ткани мозга противоположного полушария

На 30 сут. после формирования опухоли участки периферической инвазии, содержащие максимальное скопление клеток микро- и макроглии (о чем будет сказано ниже) активно окрашивались антителами к нестину, CXCR4 и TGF- $\beta$ 1 (рис. 39). Нестин принято считать одним из ключевых маркеров нейтральных стволовых и прогениторных клеток. Как было указано выше, абсолютное большинство клеток глиобластомы, использованных в эксперименте, окрашивались антителами к этому белку, что служит признаком низкой степени дифференцировки и высокой агрессивности опухолевых клеток.

Ряд авторов относит нестин к одному из маркеров ОСК злокачественных глиом. Скопление нестин-позитивных клеток в области инвазивного роста свидетельствует об их прямом участии в этом процессе. Заслуживает внимание скопление в данном участке клеток, позитивных в отношении CXCR4-антигена. Этот цитоплазматический маркер локализован на поверхности стволовых клеток всех типов и играет ведущую роль в механизмах их миграции в опухолевый очаг. Присутствие маркера CXCR4 может означать наличие в области инвазивного роста нейтральных стволовых клеток, мигрировавших из герминативных зон мозга.



**Рис. 39.** #Край опухоли в мозге крыс контрольной группы, 30 сут. эксперимента. А – иммуноцитохимическая реакция на антитела к белку стволовых клеток нестину. Нестин-позитивные клетки локализуются как на краю очага глиомы (1), так в области инвазии (2) неопластических элементов в вещество мозга. Масштаб 200 мкм; Б – иммуноцитохимическая реакция на рецепторный белок CXCR4. Клетки, несущие этот рецептор, а следовательно, мигрировавшие, локализуются как в области инвазии (1 – показаны на вставке), так и на периферии неопластической ткани (2). Масштаб 100 мкм, вставка 200 мкм; В – иммуноцитохимическая реакция на TGF- $\beta$ 1. Скопление белка выявлено вдоль границы зоны инвазии

Вместе с тем данный маркер локализован и на поверхно-

сти раковых или опухолевых стволовых клеток глиобластомы, что может свидетельствовать как об их прямом участии в механизмах инвазии при взаимодействии с микроглией, так и о взаимодействии с мигрировавшими сюда стволовыми клетками других типов, несущих на поверхности рецептор CXCR4. Кроме того, CXCR4 является компонентом клеточной мембраны микроглиальных клеток, привлекаемых опухолью. Вероятно, микросреда, создаваемая ОСК, селективно активирует микроглию M2-фенотипа, которая содействует процессам опухолевого роста и инвазии.

Особого внимания заслуживает скопление в данной области клеток, секретирующих TGF- $\beta$ 1 – лиганд, который запускает процесс эпителиально-мезенхимального перехода в опухолевых клетках и способствует обретению ими локомоторного фенотипа. Опубликованы данные о том, что TGF- $\beta$  может вызывать метастазы и прогрессию опухолевого процесса по аутокринному механизму. TGF- $\beta$  интенсифицирует пролиферацию клеток МГБ и усиливает процессы инвазии. Описана способность этого лиганда активизировать такие каскады, как Notch и Sonic Hedgehog, в раковых клетках; кроме того, сигнальный домен TGF- $\beta$  идентифицирован на поверхности ОСК глиобластомы и гемопоэтических стволовых клеток.

Анализируя данные локализации ряда маркеров в опухоли животных контрольной группы, необходимо отметить, что высокая скорость пролиферации клеток МГБ являет-

ся главной составляющей неопластического процесса. К 20-му дню эксперимента скорость пролиферации клеток опухоли начинает опережать темпы ангиогенеза, что формирует гипоксическую среду. Роль гипоксии весьма многогранна. Гипоксия является главным фактором экспрессии генов, ответственных за биосинтез цитокинов, инициирующих процессы миграции в опухоль соматических и стволовых клеток. Главная роль в этом процессе принадлежит хемокину семейства СХС – фактору стромальных клеток (SDF-1 $\alpha$ ). Лиганд выделяется в ответ на гипоксическое повреждение тканей и активно привлекает в зону неоплазии стволовые клетки. В литературе описаны сложные секреторные ансамбли, образуемые ОСК со стволовыми и дифференцированными клетками других типов (Lourenco et al., 2015).

Например, клетки МГБ продуцируют колониестимулирующий фактор. Допустимо предположить (Revoltella et al., 2012), что синтез этого лиганда является ответом на суровые условия гипоксии, формируемые благодаря высокой скорости пролиферации клеток злокачественной глиомы. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор мобилизует стволовые клетки из депо в костном мозге (Sainathan et al., 2008), и они мигрируют в опухолевый очаг, что позволяет глиоме их рекрутировать, вовлекая в секреторные ансамбли, модулируемые ОСК, индуцировать синтез трансформирующего фактора роста  $\beta 1$ , роль которого представляется весьма неоднозначной.

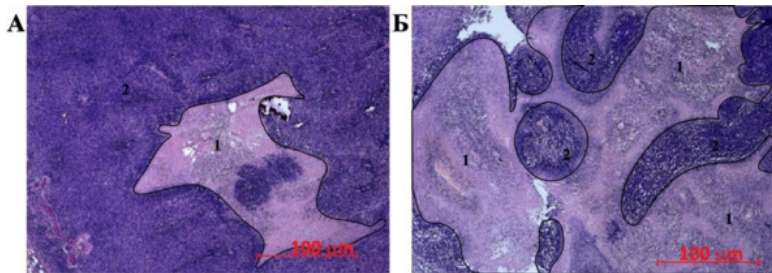
Таким образом, клетки глиомы С6 при имплантации в мозг быстро запускают пролиферативные процессы и формируют гипоксическую микросреду, индуцируют процессы направленной миграции различных типов соматических и стволовых клеток. Значительную часть привлекаемых опухолью клеток составляют микроглиоциты. Локальное скопление клеток, имеющих иммунофенотипические признаки ОСК на границах опухоли, сопровождается повышенной продукцией в этих областях TGF- $\beta$ 1.

### *Группа «клетки»*

Средняя продолжительность жизни крыс группы «клетки» составила  $41 \pm 6,8$  дня, что больше подобного показателя в контрольной группе. Средний объем опухолевого узла в мозге этих животных составил  $197 \pm 14,2$  мм<sup>3</sup>. В отличие от контрольной группы, темп нарастания неврологических симптомов был медленным, крысы длительно сохраняли активность. На 20 сут. отмечено появление птоза на стороне опухоли, снижение рефлексов на сгибание и переворачивание, дискоординация между передними и задними конечностями. К 30—40 сут. эксперимента крысы становились вялыми и заторможенными, реагировали на прикосновение к вибрисам пронзительным визгом, при выкладывании на спину не могли перевернуться. По мере нарастания симптоматики до комы животные выводились из экспери-

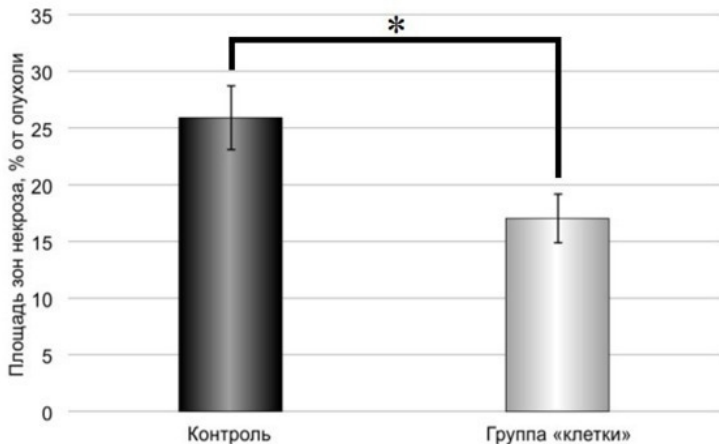
мента.

На 10-й день наблюдения морфологическая картина не обнаруживала существенных отличий от контрольной группы. Однако к 30 сут. признаки некроза в центре опухолевого узла в группе «клетки» были выражены в существенно меньшей степени (рис. 40).



**Рис. 40.** #Неопластическая ткань в мозге крыс сравниваемых групп, 30 сут. эксперимента. *А* – группа клетки: *1* – область некроза (выделена маркером), *2* – активно растущая опухолевая ткань; *Б* – опухолевая ткань в мозге крыс контрольной группы: *1* – обширные зоны некроза (выделены маркером), *2* – фрагменты сохранной опухолевой ткани. Окраска гематоксилин-эозином

Данные сравнительной оценки площади некрозов в неопластической ткани крыс контрольной группы и группы «клетки» представлены на рис. 41.

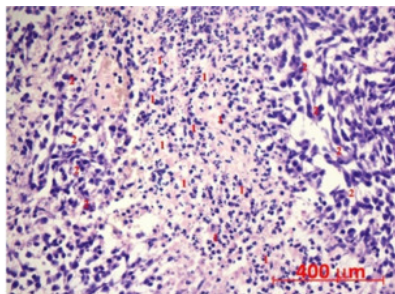


**Рис. 41.** Суммарная площадь некрозов в опухолевой ткани из головного мозга животных сравниваемых групп. По оси абсцисс: площадь зон некроза, % от суммарной площади микропрепаратов;  $M \pm s.e.m.$ ,  $n = 30$  для каждой группы. Знаком \* показаны достоверные отличия ( $p < 0,05$ ) группы «клетки» от контроля

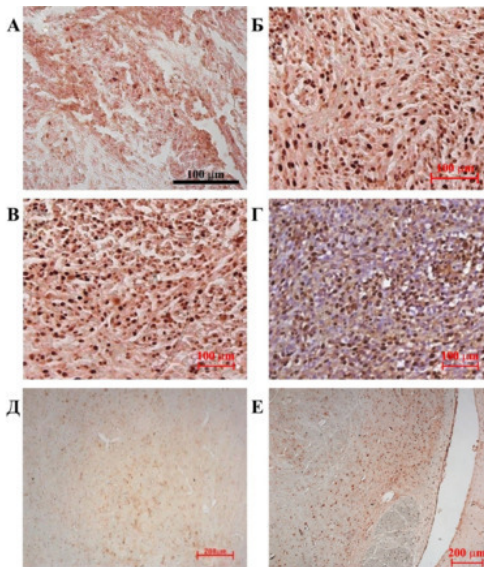
Помимо этого, опухолевая ткань из мозга крыс группы «клетки» содержала многочисленные инфильтраты в виде клеток округлой или овальной формы с эксцентрично расположенным несегментированным ядром. Локализация этих инфильтратов частично соответствовала зонам некроза опухолевой ткани, при этом они практически отсутствовали в участках инвазии неопластических клеток в парен-

химу мозга (рис. 42). Нельзя исключить, что в составе данных образований присутствуют трансплантированные ГСК, которые мигрировали в опухолевую ткань и накапливались в участках максимальной гипоксии.

Сравнение результатов иммуногистохимической реакции на антитела к PCNA свидетельствовало о некотором усилении процессов пролиферации в области опухолевого узла к 30-му дню эксперимента по сравнению с контрольной группой (рис. 43 А, Б), что, вероятно, было связано с трансформацией мигрировавших сюда ГСК. Подобная динамика сохранялась в группе «клетки» между 30—35 сут. эксперимента (рис. 43 В).

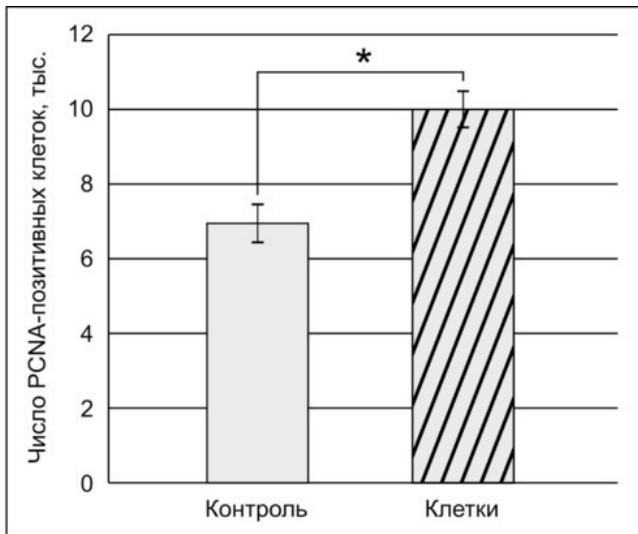


**Рис. 42.** Инфильтраты в зонах разряжения и некроза опухолевой ткани у крыс группы «клетки». Размер инфильтрирующих клеток (1) существенно меньше клеток (2) опухоли. Окраска гематоксилин-эозином



**Рис. 43.** #Неопластическая ткань в мозге экспериментальных животных. Иммуногистохимическая реакция на PCNA. *А* – контрольная группа, 30 сут.; *Б* – группа «клетки», 25 сут.; *В* – группа «клетки», 30 сут., масштаб 100 мкм; *Г* – группа «клетки», 30 сут., дополнительная окраска гематоксилин-эозином; *Д* – противоположная сторона полушария контрольных животных; *Е* – противоположная сторона полушария группы «клетки»

На рис. 44 представлены сравнительные данные о количестве PCNA-ИР клеток у животных контрольной и получивших трансплантацию ГСК групп.

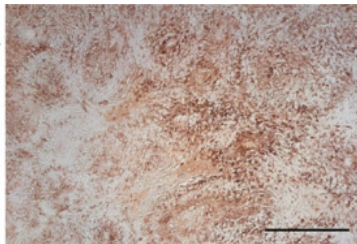
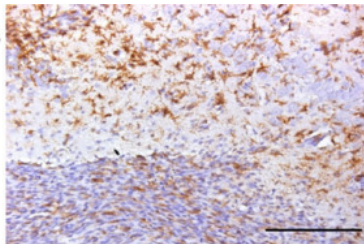
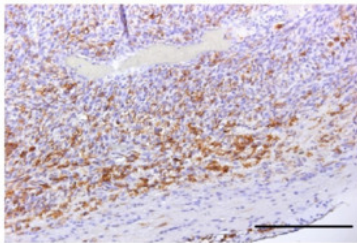
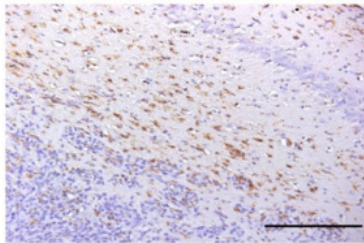
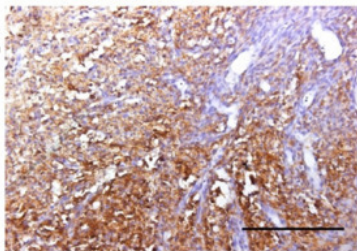
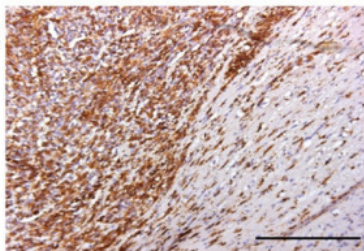
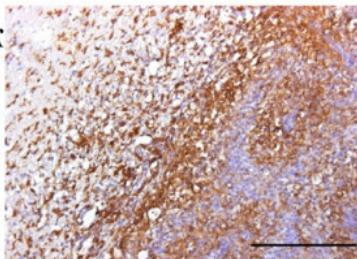
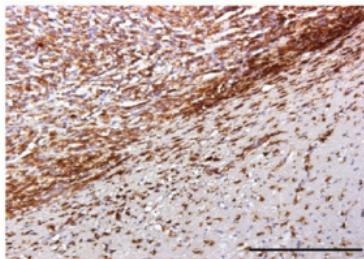


**Рис. 44.** Соотношение числа PCNA-ИР клеток в опухолевой ткани глиомы С6 в мозге крыс при введении ГСК. По оси ординат – количество (тыс.) ИР клеток на микропрепаратах для каждой точки. Указаны  $M \pm s.e.m.$ ,  $n = 30$  для каждой группы; \* – достоверные данные ( $p < 0,05$ ) в количестве PCNA-ИР между группами

Важно отметить, что усиление пролиферации наблюдалось именно в опухоли, а вне очага глиомы встречаются только единичные PCNA-ИР клетки, сосредоточенные в кровеносных сосудах или участках мозга, подвергшихся инфильтрации.

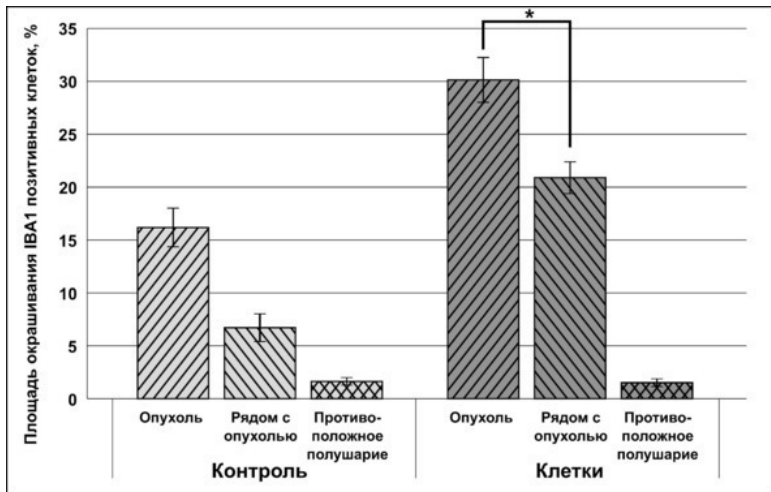
трации опухолевыми клетками. В противоположном опухоли полушарии мозга крыс контрольной группы такие клетки практически отсутствовали. В свою очередь, у крыс, получивших трансплантацию ГСК в ткани мозга на противоположные полушария, было отмечено транзиторное увеличение PCNA-ИР элементов.

Вероятно, увеличение числа PCNA-позитивных клеток в очаге обусловлено пролиферацией мигрирующих в опухоль ГСК. В пользу данного утверждения свидетельствует резкое увеличение к 30 сут. наблюдения в опухолевой ткани крыс группы «клетки» количества микроглиоцитов (рис. 45).

**А****Б****В****Г****Д****Е****Ж****З**

**Рис. 45.** #Иммуногистохимическая реакция на антитела к специфическому белку IBA1. А—Г, контрольная группа: А – центр опухоли, 30 сут.; край опухоли: Б – 10 сут., В – 20 сут., Г – 30 сут. Д—З, группа «клетки»: Д – центр опухоли, 30 сут.; край опухоли: Е – 10 сут., Ж – 20 сут., З – 30 сут. Дополнительная окраска гематоксилин-эозином. Масштаб 200 мкм

Скопления IBA1-позитивных клеток выявлялись в дистрофически измененных участках мозга, непосредственно прилегающих к опухоли и максимально подверженных инвазии, и при этом практически отсутствовали в кровеносных сосудах. Количество IBA1-ИР микроглиальных клеток в паренхиме мозга на противоположном полушарии головного мозга у крыс группы «клетки» не имело достоверных различий по сравнению с контролем (рис. 46).



**Рис. 46.** Сравнительная оценка распределения IBA1 в мозге животных. По оси абсцисс – доля площади окрашивания специфическими антителами от площади снимка, %. Данные представлены в виде  $M \pm s.e.m.$ ,  $n = 30$  для каждой группы. Знаком \* отмечены достоверные отличия ( $p < 0,05$ ) между площадью IBA1<sup>+</sup>-ткани в опухоли и участках мозга, прилегающих к ней, в группе «клетки» от группы контроля

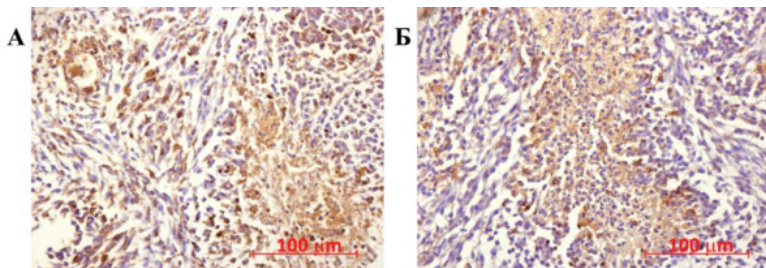
Микроглия (макрофаги) в этой связи заслуживает особого внимания. Данный тип клеток составляет более трети всех клеток, рекрутируемых МГБ (Fonseca et al., 2015). Известно, что примитивные макрофаги заселяют мозг на ранних этапах эмбриогенеза и поддерживают популяцию путем проли-

ферации, стволовые клетки костного мозга в этом процессе участия не принимают. Однако продуцируемые опухолью токсины повреждают гематоэнцефалический барьер, что делает возможным рекрутирование значительного количества моноцитов и стволовых клеток различных типов, что оставляет возможность для их трансформации в IBA1<sup>+</sup>-клетки. Однако биологическая роль таких трансформаций достаточно неоднозначна.

Морфология GFAP-позитивной астроцитарной глии в мозге животных, получивших трансфузию ГСК, не демонстрирует на всем сроке наблюдения принципиальных отличий от животных контрольной группы. Как и в контроле, на 20 сут. GFAP-позитивные звездчатые клетки концентрировались вокруг очага опухолевой инвазии и практически не обнаруживались в неопластической ткани. К 30 сут. группировка GFAP-позитивных астроцитов становилась более плотной, однако эти клетки также отсутствовали в опухолевой ткани. При этом у крыс двух сравниваемых групп в ткани мозга противоположного полушария были обнаружены только единичные GFAP-позитивные клетки.

При анализе влияния трансплантированных ГСК на опухолевый очаг наше внимание привлекло изменение количества висфатина и эндотелина-1 в очаге глиомы (рис. 47). Висфатин – фермент, который лимитирует скорость биосинтеза NAD, что играет важную роль в энергетическом метаболизме. В клетках глиомы потребность в NAD существен-

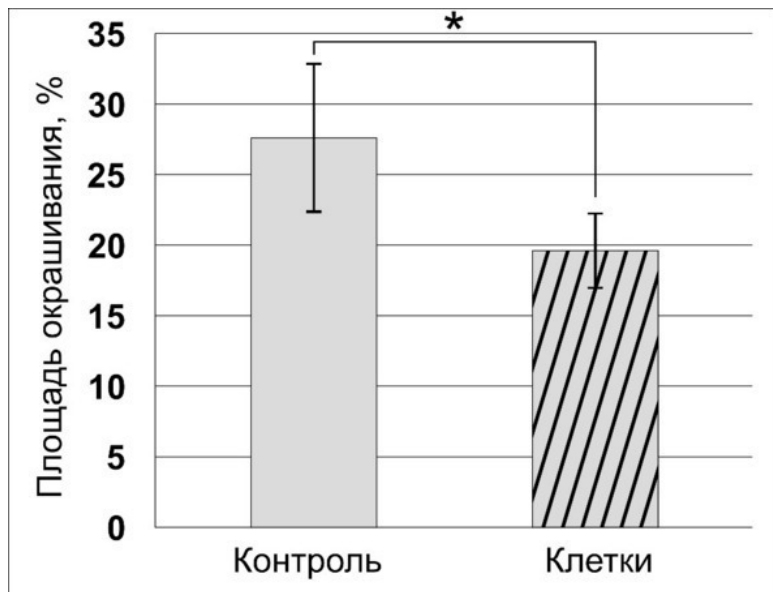
но выше, чем в нормальных клетках ЦНС, при этом степень злокачественности МГБ коррелирует с высокими концентрациями этого агента (Reddy et al., 2008). Висфатин вовлечен в процессы гомеостаза, блокирует процессы апоптоза, стимулирует выживание клеток, обеспечивает накопление висцерального жира, задействован в механизмах нейропротекции и вовлечен в нейрогенез. Данное вещество является аналогом инсулина; биологические эффекты висфатина проявляются в оптимизации процесса утилизации глюкозы, что весьма актуально в условиях ишемии. Однако спектр биологических эффектов этого лиганда намного шире.



**Рис. 47.** #Распределение висфатина в опухолевой ткани крыс контрольной группы (А) и группы «клетки» (Б). Иммуногистохимическая реакция на висфатин. Докраска гематоксилин-эозином

В опухолевых клетках висфатин стимулирует пролиферацию, миграцию, ангиогенез, ремоделирование ВКМ. В оча-

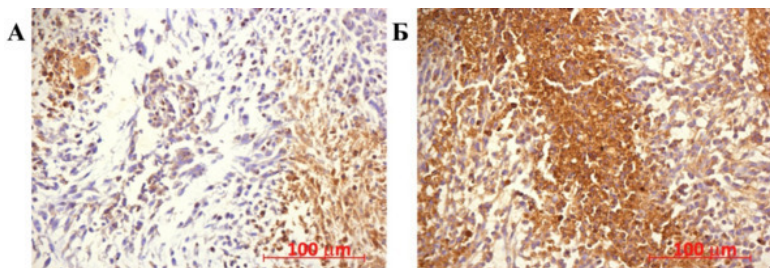
ге глиомы основным источником висфатина являются опухолевые клетки. Он также способен индуцировать процессы миграции НСК, ГСК и высокодифференцированных клеток, стимулируя в очаге продукцию MCP-1 и EGF-2. В моноцитах и макрофагах висфатин стимулирует секрецию интерлейкина-6 и -8, а также TNF- $\alpha$ . Соотношение площади окрашивания опухолевой ткани у крыс сравниваемых групп представлено на рис. 48.



**Рис. 48.** #Суммарная площадь окрашивания опухолевой ткани антителами к висфатину, 30 сут. По оси абсцисс – пло-

щадь окрашивания, % от суммарной площади. Данные представлены в виде  $M \pm s.e.m.$ ,  $n = 30$  для каждой группы

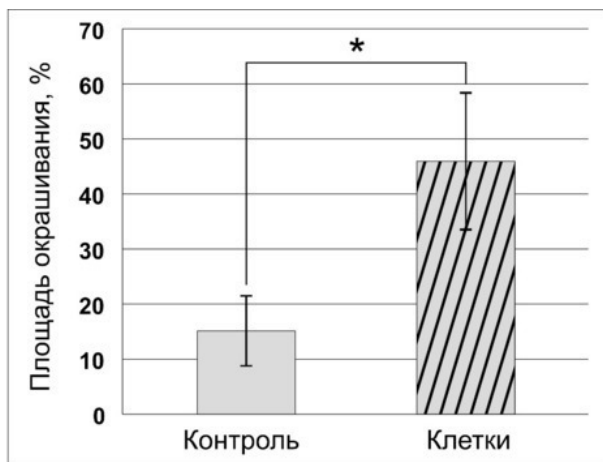
Как следует из представленных данных, тенденция к снижению продукции висфатина является одним из биологических эффектов ГСК. Это утверждение становится очевидным на фоне уменьшения размеров опухолевого узла и увеличения выживаемости экспериментальных животных, а также обнаруженного в данном исследовании увеличении количества эндотелина-1 в опухолевом очаге (рис. 49, 50).



**Рис. 49.** Иммуногистохимическая реакция на антитела к эндотелину-1. Неопластическая ткань мозга крысы группы «клетки», 30 сут. эксперимента. Дополнительная окраска гематоксилин-эозином

Будучи вазоактивным пептидом и мощным вазодилататором с противовоспалительным действием, эндотелин-1 обладает цитостатическими свойствами, конечные эффекты

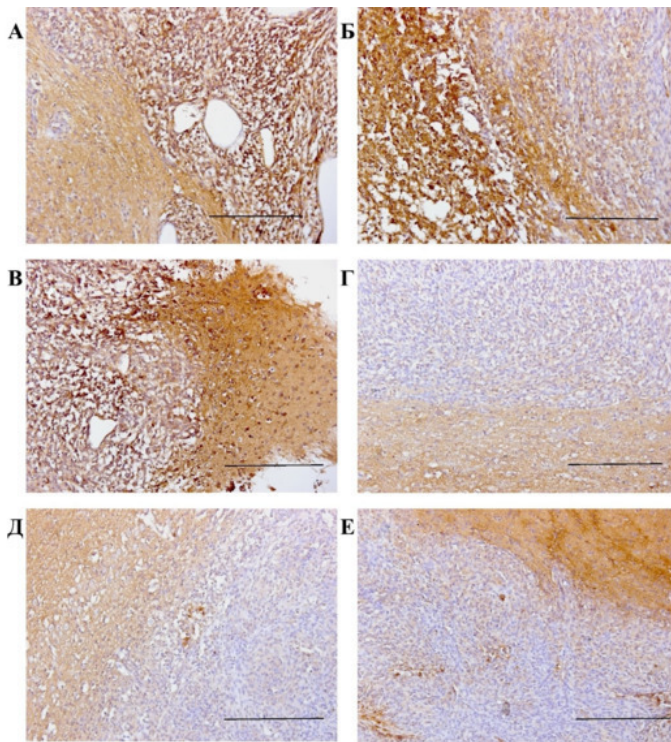
этого лиганда определяются его концентрацией и зависят от локального микроокружения.



**Рис. 50.** Суммарная площадь окрашивания опухолевой ткани антителами к эндотелину-1, 30 сут. По оси ординат – площадь окрашивания, % от суммарной площади микропрепаратов. Сравнимые данные представлены в виде  $M \pm s.e.m.$ ,  $n = 30$  для каждой группы. Знаком \* показаны достоверные ( $p < 0,05$ ) отличия сравниваемых значений в группе «клетки» от контроля

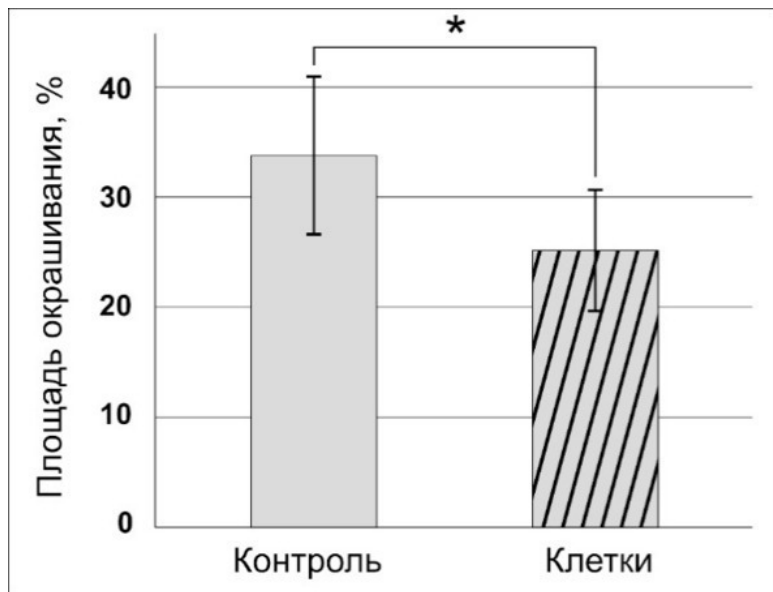
В ходе иммуногистохимической характеристики опухолевых узлов мозга крыс с глиомой С6, получивших трансплантацию ГСК, наше внимание привлекли изменения в пло-

щади окрашивания опухолевой ткани антителами к TGF- $\beta$ 1 у животных сравниваемых групп. Препараты опухолевой ткани мозга крыс контрольной группы активно окрашивались антителами к этому лиганду, при этом TGF- $\beta$ 1 был довольно равномерно распределен как в центре, так и на периферии опухоли. Данное распределение TGF- $\beta$ 1 в опухолевой ткани крыс, получавших трансплантацию ГСК, сохранялось до 20—30 сут. эксперимента (рис. 51).



**Рис. 51.** Ткань опухоли из мозга крыс, 30 сут. Иммуногистохимическая реакция на антитела к TGF- $\beta$ 1. Препарат дополнительно окрашен гематоксилин-эозином. Масштаб 100 мкм. А—В – контрольная группа, маркер распределен в опухолевой ткани; Г—Е – группа «клетки», единичные включения TGF- $\beta$ 1

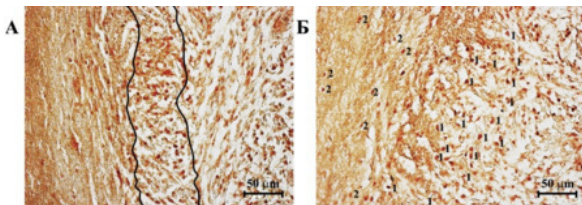
У крыс группы «клетки» к этому времени в неопластической ткани появляются многочисленные полости (рис. 51), что закономерно снижает площадь окрашивания микропрепаратов антителами к этому фактору. Весьма вероятно, что обнаруженная тенденция к сокращению площади окрашивания TGF- $\beta$ 1 может быть связана с воздействием микроглии (рис. 52) и проявляться на более поздних сроках эксперимента.



**Рис. 52.** Сравнительное распределение иммунореактивности к TGF- $\beta$ 1 в опухолевой ткани крыс сравниваемых

групп на 30 сут. По оси абсцисс – доля площади окрашивания специфическими антителами к общей площади снимков, %. Данные представлены в виде  $M \pm s.e.m.$ ,  $n = 30$  для каждой группы. Знаком \* отмечены отличия ( $p < 0,05$ ) между площадью ткани, иммунопозитивной к TGF- $\beta 1$ , в центре опухоли в группе «клетки» от группы контроля

При морфологическом анализе иммуногистохимических перестроек в опухолевой ткани животных сравниваемых групп обращало на себя внимание значительное скопление на границе опухолевого очага клеток, позитивно окрашивающихся антителами к нестину (рис. 53 А) и рецепторному белку CXCR4 (рис. 53 Б). При анализе распределения нестина и CXCR4<sup>+</sup>-клеток в сравнении с рис. 37 и 38 следует отметить более плотную группировку клеток на границе неопластического очага. Экспрессия нестина и CXCR4 свойственна как опухолевым клеткам, так и нормальным нейральным и гемопоэтическим стволовым клеткам, что свидетельствует об их способности к миграции, а следовательно, к взаимодействию с клетками других типов.



**Рис.#53.** Край опухоли в мозге крыс группы «клетки», 30 сут. *А* – иммуноцитохимическая реакция на антитела к белку стволовых клеток нестину. Многочисленные нестин-положительные клетки локализуются в области инвазии неопластических элементов в вещество мозга; *Б* – иммуноцитохимическая реакция на белок CXCR4. Клетки, несущие этот рецептор, а следовательно мигрировавшие, локализуются в области инвазивного роста (*1*)

# Конец ознакомительного фрагмента.

Текст предоставлен ООО «ЛитРес».

Прочитайте эту книгу целиком, [купив полную легальную версию](#) на ЛитРес.

Безопасно оплатить книгу можно банковской картой Visa, MasterCard, Maestro, со счета мобильного телефона, с платежного терминала, в салоне МТС или Связной, через PayPal, WebMoney, Яндекс.Деньги, QIWI Кошелек, бонусными картами или другим удобным Вам способом.