

Р.В. Салютін, Г.С. Лобинцева, Г.А. Зубкова, І.І. Дроздович, С.С. Паляниця, Т.І. Давидова

## КРИТЕРІЇ ПОВНОЦІННОСТІ ТА БЕЗПЕЧНОСТІ ТРАНСПЛАНТАТА СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ПУПОВИННОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ

*Координаційний центр трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України, Київ*

У зв'язку з наслідками Чорнобильської аварії, порушенням кровотворної, імунної, ендокринної систем і генетичного апарату, несприятливим впливом довкілля значна кількість населення України потребує комплексного лікування, включаючи трансплантацію стовбурових клітин пуповинної крові [1, 2]. Можливість використання стовбурових гемопоетичних клітин пуповинної крові людини як основного методу лікування імуно- та гемодепресій різного ґенезу підтверджено науковими дослідженнями [3].

Клітини пуповинної крові застосовують для лікування злоякісних і доброякісних захворювань кровеносної системи [4]. Останнім часом продемонстровано плюрипотентність і високу пластичність стовбурових клітин пуповинної крові, що дозволяє припускати ширше застосування їх у клітинній терапії тяжких захворювань. Крім того, клітинна терапія з успіхом використовується для ревіталізації організму, значно перевищуючи за ефективністю геріатричні засоби [4, 5].

Останніми роками в діабетології вже введено впроваджується спосіб лікування хворих на цукровий діабет із використанням ембріональних клітинних суспензій, що містять стовбурові клітини. Серед різноманітних позитивних ефектів ембріональних стовбурових клітин надто важливою є гіпоглікемічна дія. В експериментальних дослідженнях Shiroi A. 2002 року [20] було показано, що ембріональні стовбурові клітини миші на етапах розвитку ембріона здатні трансформуватись у бета-клітини острівців Лангерганса підшлункової залози, синтезувати інсулін та інсуліноподібні речовини і, отже, справляти прямий гіпоглікемічний ефект.

Є повідомлення про високу ефективність стовбурових клітин у лікуванні цукрового діабету 1-го та 2-го типів на різних стадіях захворювання, а також метаболічного синдрому [21]. Трансплантація стовбурових клітин хворим на цукровий діабет 2-го типу у складі комплексного лікування приводила до компенсації захво-

рювання, що проявлялося зниженням показників глікемії, вмісту глікованого гемоглобіну, поліпшенням ліпідного профілю. У 65% випадків після трансплантації стовбурових клітин для забезпечення компенсації було досить менших доз пероральних цукрознижувальних засобів. Одним із важливих ефектів застосування стовбурових клітин було зниження гіперінсулінемії впродовж 1-3 місяців після трансплантації в 1,5-2 рази з підтримкою нормоінсулінемії протягом 1-5 років. Тенденцію до нормалізації показників ліпідного обміну відзначали через 5-7 місяців після трансплантації зі стійкою нормалізацією через 10-12 місяців у 73% випадків. Отже, трансплантація стовбурових клітин сприяла пролонгації стану компенсації у хворих на цукровий діабет 2-го типу, що давало змогу знизити дози або навіть відмінити на певний час медикаментозну цукрознижувальну терапію [7].

Метою даної роботи була характеристика критеріїв якості стовбурових клітин пуповинної крові людини для визначення повноцінності та безпечності клітинного трансплантата.

Пуповинна кров є відносно новим, але перспективним джерелом стовбурових клітин. Хоча пуповинна кров містить менше стовбурових клітин, ніж кістковий мозок, вона має низку переваг над кістковим мозком і периферичною кров'ю.

Як було показано [6], пуповинна кров містить стовбурові клітини-попередники (CD34<sup>+</sup>) і значно більше некомітованих гемопоетичних клітин порівняно з дорослим кістковим мозком.

Результати численних досліджень довели, що неонатальна природа пуповинних гемопоетичних клітин визначає їх фенотипові та функціональні особливості, високий трансплантаційний потенціал, відносну імунологічну толерантність, протипухлинну цитотоксичність. Стовбурові клітини пуповинної крові, як показує досвід, безпечні та можуть використовуватися без добору HLA- ідентичного донора [7]. Окрім того, їм властивий високий проліферативний потенціал і мен-

ша імуногенність. У плазмі пуповинної крові, крім кровотворних клітин, містяться компоненти репродуктивних імуномодуляторів, спектр гормонів, ростові чинники, вітаміни, мікроелементи [3, 8].

З 1995 року і по теперішній час в Інституті клітинної терапії, Інституті гематології та трансфузіології АМН України, Інституті проблем кріобіології і кріомедицини АМН України, Київському центрі трансплантації кісткового мозку тощо [1, 3, 5, 7] широко ведуться наукові розробки в напрямку вивчення властивостей клітинно-компонентного складу пуповинної крові, підтверджено наявність особливостей популяційного складу ефекторних клітин, зокрема присутність у ній кровотворних клітин різного ступеня диференціації, у тому числі CD34<sup>+</sup>, що є передумовою формування імунної толерантності.

Проаналізувавши характер росту клітин з різних джерел у культурі та оцінивши їх функціональну активність, дослідники переконалися у більших проліферативних можливостях клітин ембріональної печінки й пуповинної крові порівняно з кістковим мозком, що може бути пов'язано з гетерогенністю стовбурових клітин-попередників. На думку авторів, отримані результати дозволяють стверджувати, що стовбурові клітини пуповинної крові мають більшу здатність відновлювати гемопоєз у разі трансплантації [9].

Слід зазначити, що стовбурові клітини, незалежно від їх походження, мають спільні властивості: здатні до поділу та самовідновлення впродовж тривалого часу, не спеціалізовані, можуть давати початок спеціалізованим типам клітин. Початкова популяція стовбурових клітин, що проліферують упродовж багатьох місяців культивування, може утворити мільйони клітин. Якщо кінцеві клітини продовжують бути неспеціалізованими, подібно до батьківських стовбурових клітин, вони вважаються здатними до тривалого самовідновлення [10].

Як зазначено вище, порівняно з кістковим мозком і гемопоетичними стовбуровими клітинами периферичної крові, пуповинна кров містить гемопоетичні клітини-попередники та стовбурові клітини з більшим потенціалом проліферації і самовідновлення. Але оскільки стовбурових клітин мало, час відновлення гранулоцитів і тромбоцитів значно продовжено порівняно з таким після трансплантації кісткового мозку або гемопоетичних стовбурових клітин периферичної крові [11].

За опублікованими даними, трансплантація пуповинної крові асоціювалась з меншим ступенем РТПХ порівняно з трансплантацією гемопоетичних стовбурових клітин кісткового мозку у групі як сумісних родичів, так і неродинних донорів [12]. Хоча частота гострої та хронічної РТПХ за використання пуповинної крові нижча, ніж виявлена у раніше опублікованих дослідженнях з трансплантації від неродинних дорослих донорів, вона залишається досить серйозною проблемою поряд із неприживленням і рецидивами основного захворювання [13].

З метою встановлення основних імунологічних критеріїв якості стовбурових клітин досліджували імунологічні аспекти трансплантації гемопоетичних клітин пуповинної крові. У разі пересадки стовбурових клітин пуповинної крові від донорів із неповною HLA-сумісністю результати трансплантації виявились задовільними [14], що, на думку авторів, вказує на меншу імунореактивність пуповинної крові порівняно з кістковим мозком.

Як зазначено вище, детальне вивчення клітинного складу пуповинної крові виявило особливості як фенотипного спектра ефекторних клітин імунної системи, так і їх функціональної активності, що дозволило розглядати пуповинну кров як джерело гемопоетичних стовбурових клітин із відносно низьким ризиком розвитку реакції "трансплантат проти хазяїна" [5].

Серед ознак функціональної незрілості імунокомпетентних клітин пуповинної крові слід відзначити дисбаланс цитокінів і зниження чутливості до цитокінової регуляції імунної відповіді. Пригнічення активності цитотоксичних лімфоцитів вважається чинником, який сприяє формуванню імунологічної толерантності до гемопоетичної тканини [15]. У популяції лімфоцитів пуповинної крові, на відміну від периферичної крові та кісткового мозку дорослих донорів, переважають неактивні, незрілі лімфоцити і клітини-супресори [16]. Це свідчить про знижену готовність Т-лімфоцитів пуповинної крові до імунної відповіді. Важливою особливістю моноцитарної популяції клітин пуповинної крові є низький вміст функціонально повноцінних і активних антигенпрезентуючих клітин [17].

З одного боку, невисокий ступінь зрілості ефекторних клітин імунної системи у пуповинній крові розширює показання до їх застосування в клініці, крім того, це обумовлює меншу інтенсивність імунного конфлікту між клітинами

донора та реципієнта. Але з іншого боку, відомо про існування кореляції між ступенем розвитку реакції "трансплантат проти хазяїна" і протипухлинною дією, тобто розвитком ефекту "трансплантат проти лейкозу" [18].

У зв'язку з цим було проведено дослідження протипухлинної цитотоксичності клітин пуповинної крові. Одержані результати свідчать, що попри дійсно слабшу відповідь імунокомпетентних клітин пуповинної крові на антигенну стимуляцію активовані лімфоцити насамперед є природними кілерами і кілероподібними клітинами, які беруть активну участь у механізмах реалізації протипухлинної цитотоксичності. Крім того, у пуповинній крові знайдено субпопуляції лімфоцитів із фенотипом  $CD16^+CD56^+$  і  $CD16^+TCR\alpha/\beta^+$ . Є припущення, що саме ці клітини в активованій формі реалізують реакцію "трансплантат проти хазяїна" [16].

Головним бар'єром на шляху рутинного використання трансплантатів є суттєві відміни гістосумісності між індивідами. Саме ці показники належать до найголовніших, від яких залежить результат застосування донорських клітин. Характеристики гістосумісності визначають, чи буде імунна система одного індивіда розпізнавати тканини іншого як чужі та, отже, намагатись відторгнути їх, проявляючи реакцію "хазяїн проти трансплантата", чи навпаки, трансплантовані стовбурові клітини будуть розвивати реакцію "трансплантат проти хазяїна".

У клініках і лабораторіях широко обговорюється питання переваг і недоліків у доборі анатомічного джерела клітин-попередників, але, по суті, вирішальним чинником результатів трансплантації стовбурових клітин є визначення імунного походження донорських клітин. Цей показник треба вважати за основний імунологічний критерій якості трансплантата стовбурових клітин. Як відомо, за імунологічним походженням розрізняють такі типи донорських клітин: аутологічні, сингенні, алогенні [13].

В аутологічній трансплантації використовують власні клітини, тобто хазяїн і донор – один організм. У цій ситуації спостерігається низький рівень відторгнення трансплантата, відсутня реакція "трансплантат проти хазяїна", спостерігається швидке відновлення імунної системи, не розвивається післятрансплантаційна імуносупресія. Поряд із цим, є ціла низка недоліків, які не дозволяють застосовувати власні донорські клітини. Один із них – ризик перенесен-

ня захворювання, інший – неможливість застосування аутологічної трансплантації для лікування генетичних хвороб або станів, за яких більшість стовбурових клітин є патологічними внаслідок набутих захворювань (деякі види лейкозів, мієлодисплазії, апластична анемія тощо).

Сингенна трансплантація можлива тоді, коли у реципієнта є однойцевий близнюк, спроможний стати донором стовбурових клітин-попередників. Це забезпечує відсутність імунного бар'єру для трансплантації, оскільки хазяїн і донор генетично ідентичні. Коли такий вибір існує, застосування сингенного клітинного трансплантата має більші переваги порівняно з аутологічним, оскільки виключає можливість зараження стовбурових клітин. Водночас дану методику не можна використовувати за наявності генетичних захворювань, її показано лише для лікування набутих захворювань [13].

Алогенна трансплантація, коли задіяні механізми розпізнавання як із боку реципієнта, так і з боку донора, може призвести до тяжкої патології. Головний чинник гістосумісності у людей визначається набором генів реципієнта та донора у складі головного комплексу гістосумісності (МНС). Молекули МНС кодовані на 6-й хромосомі людини та належать до двох головних класів. У I класі МНС головними складовими молекули є HLA-A, -B, -C у II класі МНС – HLA-DR, -DPI, -DQ [19].

Молекули I і II класів МНС є поверхневими білками клітини. Вони виконують імунну функцію розпізнавання чужих антигенів, які з'єднуються з молекулою МНС, розпізнаються T-лімфоцитами, що включає диференційовану імунну відповідь на даний антиген. T-клітини  $CD4^+$  розпізнають антиген, зв'язаний із молекулами II класу МНС, тоді як T-клітини  $CD8^+$  – антиген, зв'язаний з молекулами I класу, тобто молекули II класу МНС ініціюють активацію імунної відповіді, а молекули I класу – її супресію. Подальший розвиток імунної відповіді залежить від клітинних і цитокінових сигналів, а також від взаємодії декількох типів імунних клітин [13].

HLA-типівання визначає ідентичність за головними антигенами гістосумісності реципієнта та донора. Проте існує велика кількість другорядних локусів гістосумісності, які впливають на результат трансплантації, але які складно контролювати на молекулярному рівні. Тому навіть якщо донором і реципієнтом є сибси, цілком HLA-сумісні за усіма визначеними локусами

МНС, частота гострого та хронічного відторгнення залишається на рівні 30-60%.

Отже, HLA-система є поліморфною, існує велика кількість різних алелей для кожної молекули HLA, але для проведення алогенної трансплантації клітин-попередників часто визначають лише ті показники HLA-типів, які мають найбільше значення для клінічного результату трансплантації. Найчастіше визначають три HLA-молекули, а саме HLA-A, HLA-B і HLA-DR.

Оскільки організм має по дві копії кожної з цих молекул, HLA-типівання передбачає характеристику кожного індивіда за шістьма HLA-антигенами (по дві молекули HLA-A, HLA-B і HLA-DR). Пара донор-реципієнт вважається цілком сумісною, якщо ці 6 молекул виявляються ідентичними [13].

### ВИСНОВКИ

1. Пуповинна кров як джерело стовбурових клітин має низку переваг порівняно з кістковим мозком і периферичною кров'ю, хоча і містить менше стовбурових клітин.

2. Розробка критеріїв якості та повноцінності культури стовбурових клітин, отриманих із пуповинної крові, дозволить підвищити ефективність трансплантації стовбурових клітин як методу лікування.

3. Для розробки нових методів лікування необхідно визначити та стандартизувати критерії якості, успішного диференціювання, трансплантації та приживлення клітин.

### ЛІТЕРАТУРА

1. *Цуцаєва А.О., Грищенко В.І., Кудокоцева О.В., Прокопюк О.С., Щеглов А.В., Тупчієнко Г.С., Ходько О.Т., Бондаренко І.А.* Заготівля, кріоконсервування та клінічне застосування гемопоетичних клітин кордової крові людини // Методичні рекомендації. – Київ, 2000. – 16 с.
2. *Лобынцева Г.С., Бихунов В.Л., Ворожка І.В.* Основные требования к препаратам гемопоэтических клеток пуповинной крови и перспективы клинического применения // Трансплантология. – 2008. – Т. 10. – № 1. – С. 69-71.
3. *Лобынцева Г.С., Гладких Ю.В., Любынцев Д.В., Гладких В.Ю.* Стволовые эмбриональные гемопоэтические клетки человека. Часть 1. – К.: Наукова думка, 2004. – 186 с.
4. *Кухарчук О.Л., Радченко В.В., Сирман В.М.* Стволовые клетки: эксперимент, теория, клиника // Черновцы: Золоті литаври, 2004. – 505 с.
5. *Перехрестенко П.М., Глухенька Г.Т., Калиниченко Т.О., Алгазінова М.К.* Особливості популяційного складу гемопоетичних клітин пуповинної (кордової) крові в аспекті клінічного застосування // Укр. журн. гематол. та трансфуз. – 2001. – № 2. – С. 38-41.
6. *Бабийчук Л.А., Рязанцев В.В., Зубов П.М., Зубова О.Л.* Гемопоэтические стволовые клетки кордовой крови: новые методы выделения и криоконсервирования // Трансплантология. – 2007. – Т. 9. – № 1. – С. 13-15.
7. *Бабийчук Л.А., Грищенко В.И., Кудокоцева О.В., Рязанцев В.В., Зубова О.Л., Зубов П.М., Гурина Т.М.* Создание криобанка пуповинной крови на основе новых технологий криоконсервирования // Трансплантология. – 2007. – Т. 9. – № 1. – С. 16-18.
8. *Бабийчук Л.А., Кудокоцева О.В., Рязанцев В.В., Зубов П.М., Зубова О.Л., Гурина Т.М.* Современные подходы к количественному и качественному учету криоконсервированных стволовых клеток кордовой крови в аутобанке Харькова // Трансплантология. – 2008. – Т. 10. – № 1. – С. 119-121.
9. *Білько Н.М., Ярошенко О.Я., Василевська С.В., Вотякова І.А., Білько Д.І.* Оцінка проліферативного потенціалу кровотворних стовбурових клітин, отриманих з онтогенетично різних джерел // Трансплантология. – 2003. – Т.4. – № 1. – С. 58-59.
10. *Медицина біологія / За ред. В.П. Пішака, Ю.І. Бажори.* – Вінниця: Нова Книга, 2004. – 656 с.
11. *Gluckman E., Rocta V., Boyer-Chammard A. et al.* Jut come of cord blood transplantation from related and anrelated donors // N. Engl. J. Med. – 1997. – Vol. 337. – P. 373-381.
12. *Wagner J.E., Kernan N.A., Steinbuch M. et al.* Allogenic sibling umbilical cord blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease // Lancet. – 1995. – Vol. 346. – P. 214-219.
13. *Румянцев А.Г., Масчан А.А.* Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей // М.: Медицинское информационное агентство, 2003. – 912 с.
14. *Cairo M.S., Wagner G.E.* Placental and/or umbilical cord blood: an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation // Blood. – 1997. – Vol. 90. – P. 4665-4678.
15. *Harris D.T.* Experience in autologous and allogeneic cord blood banking // J. Heamatother. – 1996. – Vol. 5, № 2. – P. 123-128.
16. *Harris D.T., Schumacher M.J., Locascio J.* Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T-lymphocytes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – Vol. 89, № 21. – P. 10006-10010.
17. *Торубарова Н.А., Кошель И.А., Кошель И.В., Яцьк Т.В.* Кроветворение плода и новорожденного // М.: Медицина, 1993. – 203 с.
18. *Antin J.H.* Graft-versus leukemia: no longer an epiphenomenon // Blood. – 1993. – Vol. 82, № 8. – P. 2273-2277.

19. Dupont B. Immunology of hematopoietic stem cells transplantation. A brief review of its history // Immunol. Rev. – 1997. – Vol. 157. – P. 5-12.
20. Shiroy A., Yoshikawa M., Yokota H. et al. Identification of insulin-producing cells derived from stem cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating // Stem cells. – 2002. – Vol. 20. – P. 284-292.
21. Смикодуб О.І., Новицька А.В. Лікування хворих на цукровий діабет 2 типу в дебюті захворювання ембріональними стовбуровими клітинами // Трансплантологія. – 2007. – Т. 9, № 1. – С. 278-282.

## РЕЗЮМЕ

**Критерии полноценности и безопасности трансплантата стволовых клеток пуповинной крови**

**Р.В. Салютин, Г.С. Лобынцева, Г.А.Зубкова, И.И. Дроздович, С.С. Паляница, Т.И. Давыдова**

В работе представлены результаты определения критериев качества стволовых клеток пуповинной крови человека для обеспечения их полноценности и безопасности при трансплантации. Показано, что пуповинная кровь как источник стволовых клеток

имеет ряд преимуществ по сравнению с костным мозгом и периферической кровью, хотя и содержит меньше стволовых клеток. Разработка критериев качества и полноценности стволовых клеток позволит повысить эффективность их трансплантации как метода лечения.

**Ключевые слова:** трансплантация, костный мозг, стволовые клетки, пуповинная кровь, критерии качества.

## SUMMARY

**Criteria for the adequacy and safety of the transplant cord blood stem cells**

**R. Salyutin, G. Lobyntseva, G. Zubkova, I. Drozdovich, S. Palyanitsa, T. Davydova**

The results of the definition of criteria of quality of stem cells from umbilical blood to ensure their adequacy and safety in transplantation. It is shown that umbilical cord blood as a source of stem cells has several advantages compared with bone marrow and peripheral blood, though it contains fewer stem cells. Developing criteria for quality and adequacy of stem cells will improve the efficiency of their transplants as a treatment modality.

**Key words:** transplant, marrow, stem cells, cord blood, criteria of quality.

Дата надходження до редакції 05.02.2011 р.