



SCIENTIFIC RATIONALE FOR STEM CELL TREATMENT ТЕОРЕТИЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ЗАСТОСУВАННЯ ГЕМОПОЕТИЧНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН В КЛІНІЧНІЙ ПРАКТИЦІ

Derpak Yuriy Yu.

Medical Center of Kyiv Research Center – Medical Technology, Kyiv, Ukraine

Derpak Kateryna Yu.

Kyiv Medical University, Kyiv, Ukraine²

Stem cell transplantation is becoming a more common procedure in the treatment of pathological states and a number of different diseases.

Goal of Research. *Analyze the information about the stem cell (SC) biology (description, properties) offering great opportunities of SC application in treatment of hematologic, skin, oncological, hereditary, immunologic diseases.*

Use of embryonic stem cells requires further study of possible SC application in clinical practice that directly depends on the tolerance limits in legal and ethical aspects as well as development of the appropriate legislation for this branch of medicine.

Materials and Methods. *Systems analysis, structural and logical analysis as well as referential-semantic analysis were used. Materials were public sources of information and scientific research publications.*

Results. *Use of auto- and allotransplants of hematopoietic SCs harvested from the alternative sources, in particular, cord blood, embryonic liver, bone marrow, in clinical transplantation is a perspective research method of the new direction in the treatment of serious diseases. Development of the new transplantation technologies with the use of non-myeloablative conditioning and transplant purification methods, application of the new generation of hematopoietic growth factors, dendritic cell vaccination have already gone beyond the limits of the experiment and began to be actively implemented into clinical practice, which brought about a large number of scientific, bioethical, religious, legal and legislative issues.*

Conclusions. *In the process of studying the general aspects of stem cell (self-renewal, differentiation, plasticity, asymmetric division, niche, stromal support), new possibilities of stem cell application in regenerative medicine and cell therapy are discovered. Finding solutions to SC transplantation-related problems gives ill people chance for treatment and longer life.*

Key words: *hemopoetic stem cell, mesenchymal stem cell, progenitor stem cell, regenerative medicine, stem cell therapy.*

Молекулярна поверхня гемопоетичних стовбурових клітин (hematopoietic stem cells) людини (ГСК) містить низку білкових антигенів, що мають різне спеціальне призначення та специфічні функції. Завдяки цим маркерам поверхні мембрани гемопоетичних стовбурових клітин наділені певними характеристиками та властивостями.

Стовбурові клітини, отримані із кісткового мозку, із периферійної крові, із пуповинної (кордової) крові дають популяцію поліпотентних клітин, які не різняться за морфологічними показниками, функцією і проліферативним потенціалом. Визнано єдиним попередником для клітин всіх паростків кровотворення є стовбурава кровотворна клітина і її головний мембранний маркер – антиген CD34. Визначення коекспресії мембранних маркерів на клітинах, включно CD34, є основним методом, який дозволяє встановити наявність субпопуляцій клітин-попередників у клітинних культурах [1, 2, 6].

Кістковий мозок (КМ) дорослої людини містить 1-2 % гемопоетичних і стромальні стовбурові (прогеніторні) клітини [3,5]. Кровотворні клітини



розділяють на ГСК, здатні до тривалої постійної реконструкції всієї гемопоетичної системи и прогеніторні клітини, здатні до короткої (1 – 2 місяці) реконструкції [4].

Популяція мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) КМ більше ніж на 98 % є гомогенною і при певних умовах *in vitro* ці клітини легко диференціюються в сполучноклітинні клітинні лінії, включно остеобласти, хондроцити і адипоцити [7,15]. При ортотопічній імплантації *in vivo* цих клітин також були отримані тканини названих ліній [11, 38].

В популяції CD34⁺- клітин знаходяться всі ранні гемопоетичні попередники: від примітивних стовбурових, гемопоетичних колонієутворюючих клітин до уніпотентних - КОЕ –ГМ, БОЕ-Е, БОЕ-МК (відповідно еритроцитарна, мегакаріоцитарна і плуріпотентних попередників – колонієутворююча одиниця еритроцитів, гранулоцитів, мегакаріоцитів (КОЕ-ГЕММ, CFU-Mix), колонієутворююча одиниця бластів (КОЕ-Бл, CFU-Blast), ранніх В- і Т-лімфоїдних попередників, експресуючих TdT-антиген [8, 9, 11, 34].

Існує декілька ієрархічних субпопуляцій кістковомозкових CD34⁺- клітин [10, 11, 20, 24, 32]. Субпопуляція з фенотипом CD34⁺ CD38⁻ Th1⁺CD45RO⁺HLADR^{low}CD45^{-/low}CD71^{-/low} – це найбільш примітивні некомітовані поліпотентні стовбурові кровотворні клітини. На них можлива експресія деяких диференційованих антигенів мієлоїдного CD33, CD13, CD15 і лімфоїдного - CD4, CD7 рядів гемопоезу. В зв'язку з чим в кістковому мозку ідентифікуються в меншій кількості субпопуляції з такими фенотипами: CD34⁺CD38⁻ Th1⁺CD33⁺, CD34⁺CD38^{-/low}CD13⁺, CD34⁺CD13⁺, CD34⁺ CD38^{-/low}Th1⁺CD71^{low}HLA-DR^{+/low}C4⁺D34⁺CD7⁺ [12, 17, 25].

Субпопуляція клітин з фенотипом CD34⁺ CD13⁺CD71HLA-DR⁺ - це лінійні комітовані клітини-попередники, які включають 6 субпопуляцій:

- CD34⁺ CD38⁻HLA-DR⁺CD45RA⁺ CD33⁺ - мультипотентні клітини-попередники гранулоцитарно-моноцитарної, еритроїдної і мегакаріоцитарної ліній,
- CD34⁺ CD38⁻HLA-DR⁺CD45RA⁺ CD33⁺ CD13⁺CD64⁺ - це клітини-попередники, комітовані в гранулоцитарному напрямку,
- CD34⁺ CD38⁻HLA-DR⁺CD45RO⁺ CD71⁺ - ранні еритроїдні клітини-попередники,
- CD34⁺ CD38^{low}HLA-DR⁺CD33⁺ (CD61⁺) – ранні клітини-попередники мегакаріоцитів,
- CD34⁺ CD38⁺HLA-DR⁺CD10⁺ CD19⁺ - ранні клітини-попередники В-лімфоцитів,
- CD34⁺ CD38⁺CD33⁺ CD4^{low}CD7⁺ CD45RA⁺CD3⁻CD8⁻ - ранні клітини-попередники Т-лімфоцитів [13, 22, 26].

Експресія поверхневих протеїнів клітини часто використовується для характеристики різних клітинних типів. Ці поверхневі молекули відповідальні за гетеро – і гомотипові взаємодії між клітинними типами, і одночасно виступають рецепторами для факторів росту, цитокінів чи міжклітинного матрексу. Експресія цих молекул МСК аналізується методом RT-PCR (зворотня



транскриптаза – полімеразна ланцюгова реакція) мРНК і результати підтверджуються проточною цитометрією. Більшість класів поверхневих молекул МСК відомі. Розрізняють наступні: **специфічні антигени:** SH2, SH3, SH4, STRO-1, гладком'язовий α -актин MABI740, Thy-1, **цитокіни і фактори росту:** інтерлейкіни 1a, b, 7, 8, 11, 12, 14 і 15, LIF, SCF, Flt-3 ліганд, GM-CSF, G-CSF, M-CSF; **рецептори цитокінів і факторів росту:** IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, LIFR, SCFR, G-CSFR, IFN γ R, TGF β IR, TGF β IIIR, TNFIR, TNFIIIR, bFGFR, PDGFR, EGFR, **молекули адгезії:** ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, ендоглін, CD44 (рецептор до гіалуронану), інтегрини α V β 3, α V β 5, інтегринові ланцюги α 1, α 2, α 3, α 4, α 5, α A, α V, β 1, β 2, β 3, β 4, LFA-3, L-селектин; **молекули міжклітинного матриксу:** колагени I, III, IV, V і VI типів, фібронектин, ламінін, гіалуронан, протеоглікани [14,16, 28, 35].

У ході цитометричного дослідження вивчаються ці білкові маркери поверхні мембран (ПММС) ЗСК з метою картування рівня їхньої експресії та подальшого профілювання цих даних для надранньої молекулярно-біологічної діагностики низки фатальних захворювань людини.

Стромальні СК КМ включають дорослі мезенхімальні (МСК) (mesenchymal stem cells) і мультипотентні дорослі прогеніторні клітини (mesenchymal progenitor cells), всі вони здатні до мультилинійної диференціації [18, 33]. В культурі МСК стабільно підтримується недиференційований фенотип. Мультипотентні дорослі прогеніторні клітини (мезодермальні прогеніторні клітини (МПК), мають властивість диференціюватися в багато чисельні клітинні лінії і навіть в ендотеліальні клітини.

Відомий факт відсутності експресії у культурах МСК людини гемопоетичних маркерів CD14, CD34, CD45 та ендотеліальних маркерів – фактор фон Вілебранта, Р-селективна.

Саме низка поверхневих молекул дає розуміння того, що поверхневі цитокіни і взаємодія їх стимулюють клітинну відповідь і клітинну диференціацію.

Гіпотетично, КМ містить також гемангіобласти – клітини-попередники гемопоетичної і ендотеліальної лінії із потенціалом до неоваскуляризації. Lin-c-kit⁻ клітини не є стовбуровими і не здатні до регенерації кардіоміоцитів при трансплантації [3, 21], в той час Lin-c-kit⁺ клітини можуть генерувати клітини серця, гладкі м'язові клітини і ендотеліальні клітини [24]. Негемопоетична (CD34⁻) субпопуляція клітин КМ, до якої входить AC133⁺ клітини має також виражений ангиогенний потенціал.

Окрім того МСК КМ можуть виробляти, чи бути індукованими до виробництва цитокінів для підтримки гемопоетичних клітин [11, 29]. МСК КМ підтримують життєздатність і розмноження ГСК, виступаючи при цьому функціональною строюю [11, 37].

В культурі розмноження одиничної МСК людини до 1×10^6 клітин представлено 21 подвоєння популяції, і потомство, деяких із них дає початок колоніям, які зберігають свою мультипотентність. При аналізі каріотипу 12 пасажей МСК, які піддалися 30 подвоєнням популяції, ніяких хромосомних аберацій не було знайдено. Постає питання чи можуть МСК поділятися до



безкінечності? В даний час існує поняття обмеження розмноження МСК, що проявляється у сповільненні темпів проліферації культури і змін в популяціях багаторазово розігнаних клітин, поява масивних розпластаних клітин, які не діляться (клітинна сенесценція). Багатьох дослідників залишається відкритим питання створення умов для безкінечного розмноження МСК. За даними Pittenger et fl. [19] із 25 мл аспірованого КМ отримано 1×10^9 МСК людини.

Концепція мультипотентних СК КМ для сполучної тканини вперше була представлена Owen у 1985 році [3, 5] і базувалася на твердженні, що диференційовані клітинні типи, які знаходяться в стромі КМ, можуть походити від певної прогеніторної чи самої СК. В даний час існують докази того, що строма складається із диференційованих і недиференційованих клітин декількох ліній, і що МСК людини в КМ існують із прогеніторними клітинами (МПК), які мають обмежений потенціал до диференціації.

Проблемою використання МСК в терапевтичних цілях виступає можливість трансплантації цих клітин (тип прогеніторних клітин) і варіант переносу (доставки) МСК, пряма (ін'єкція чи імплантація) чи системна інфузія, яка є більш оптимальна. Перший варіант краще підходить для місцевого відновлення або регенерації кістки [22,29], хряща [28], сухожилля [8]. Доставка кровотоком МСК є важливою у відновленні не тільки місцевих, алей системних тканинних дисфункцій. Існує думка, що інфузія МСК призводить до селективного роумінгу в ділянки кістковомозкової стромы, що сприяє покращанню функції гемопоез-підтримуючої стромы, що сприяє полегшенню диференціації ГСК [3,30].

Перші клінічні випробування показали, що системна інфузія *in vivo* ГСК, МСК при галогенній трансплантації кісткового мозку у дітей із сповільненим остеогенезом призвела до значних гістологічних змін трабекулярної кістки, що є свідченням нового щільного кісткового утворення [25, 31].

МСК людини із КМ є корисною популяцією клітин, які ефективно можуть застосовуватися для галогенної трансплантації. Вони експресують невелику кількість молекул I класу головного комплексу гістосумісності і в той же час практично не експресують молекули II класу і V β -костимулюючі молекули, які відіграють важливу роль в ініціюванні антиген специфічної імунної відповіді [4, 36].

Серед факторів, які негативно впливають на відновлювальний потенціал МСК виступають: втрата контакту із мікрооточенням і/або втрата тіломер. Якщо клітина позбавлена свого нормального стромального мікрооточення, можливий запуск програми диференціації під час міграції до ділянки пошкодження і таким чином втрачати свій відновлювальний потенціал, оскільки вони більше не знаходяться у відповідному міжклітинному контакті і не отримують більше стимулів від певних цитокінів і хемокінів, зберігаючи свій стовбуровий статус. Зростаюча кількість клітинних поділів (симетричних і асиметричних) може призвести до вкорочення тіломер, при кожному зниженні чи повністю зникненні тіломеразної активності [1, 3, 5, 36].

Отже, як важливий складовий компонент кістковомозкової стромы, трансплантація МПК окремо чи в комплексі із гемопоетичними прогеніторними



клітинами, буде успішно сприяти приживленню ГСК після мієлоаблятивної терапії. При лікуванні онкологічних захворювань ці клітини застосовуються для: подолання обмежуючої гематологічної токсичності курсу протипухлинної терапії, елімінації пухлинних клітин, що не піддаються впливу звичайних доз цитостатиків, додаткове забезпечення протипухлинної імунної реакції [11, 37].

Висновок.

Застосування ЕСК потребує подальшого вивчення і клінічних можливостей. Перспективним є впровадження досліджень щодо доцільності використання ауто – і алотрансплантатів СК гемопоетичної тканини, отриманих із альтернативних джерел, зокрема, пуповиної крові, ембріональної печінки в клінічній трансплантації, розробка нових трансплантаційних технологій із застосуванням немієлоаблятивних режимів кондиціювання, очистки трансплантату, застосування гемопоетичних факторів росту нової генерації тощо.

Література.

1. Spradling A., Drummond-Barbosa D., Kai T. Stem cells find their niche Nature. 2001;414:98–104.
2. Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Robey P.G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology and potential applications. Stem Cells. 2001;19:180 – 192.
3. Kuchartschuk O.L., Radtchenko V.V., Sirman V.M. Stvolovye kletky; eksperiment, teoriya, klinika. KRS- melytchynskie technology. 2004:504
4. Morrison S.J., Shah N.M., Anderson D.J. Regulatory mechanisms in stem cells biology. Cell. 1997;88:287–298.
5. Видиборець С. В., Дерпак Ю. Ю. Трансплантація стовбурових клітин: від визначення до можливостей клінічного застосування // «Сімейна медицина. Європейські практики». - № 1 (103). — 2023. С. 5 - 10.
6. Андреева Л. Ю., Тупицын Н. Н. Субпопуляции периферических стволовых гемопоэтических клеток (ПСГК). Проточно-цитофлуориметрическая идентификация ПГСК на основании светорассеивания, экспрессии CD34, CD45, AC133* // Вопросы гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2002. Т. 1, №1. С. 60—65.
7. Brown D.V. et al. Expression of CD133 and CD44 in glioblastoma stem cells correlates with cell proliferation, phenotype stability and intra-tumor heterogeneity / D.V. Brown, G. Filiz, P.M. Daniel et al. // PLoS One. 2017. Feb. 27; 12 (2): e0172791.
8. Андреева Л. Ю., Тупицын Н. Н. Субпопуляции периферических стволовых гемопоэтических клеток: характеристика фракции ранних стволовых клеток Thy-1 (CD90) -антигена // Клиническая геронтология. 2005. Т. 11, №10. С. 44—50.
9. Брюховецкий А. С. и др. Стволовые клетки и регенеративная медицина в лечении нервных болезней. Т. II: Клинические аспекты применения стволовых клеток и технологий регенеративной медицины при некоторых заболеваниях и повреждениях центральной нервной системы / А. С. Брюховецкий, Ю. С. Хотимченко, Х. Хунюнь, Ч. Лин. Владивосток: Дальнаука, 2018. 632 с.



10. Брюховецкий А. С., Хотимченко Ю. С. Стволовые клетки и регенеративная медицина в лечении нервных болезней. Т. I: Теоретические, фундаментальные и общие аспекты применения стволовых клеток и технологий регенеративной медицины в лечении нервных болезней: руководство для врачей. Владивосток: Дальнаука, 2018. 456 с.

11. Гривцова Л. Ю., Тупицын Н. Н. Мобилизованные стволовые кроветворные клетки: аутологичная и аллогенная трансплантация в онкологической практике // Иммунология гемопоеза. Т. 1. 2017. С. 3—63.

12. Fuch ., Segre J.A. Stem cells: A new lease on life. *Cell*. 2000;100:143–155.

13. Weissman I.L. Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000;100:157–168.

14. Yosida K., Chambers I., Nichols J. Maintenance of the pluripotential phenotype of embryonic stem cells through direct activation of gr 130 signaling pathways. *Mech. Dev.* 1994;45:163-171.

15. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J, Shapiro S.S., Waknitz M.A. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282:1145-1147.

16. Reubinoff B.E., Pera M. F., Fong C.Y., Trounson A., Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: Somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.* 2000;18:399–404.

17. Schuldiner M., Yanuca O., Itskovitz-Eldor J., Melton D., Benvenisty N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000;97:11307-11312.

18. Odorico J.S., Kaufman D.S., Thomson J.A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*. 2001;19:193–204.

19. Pittenger M.F., Thiede M.A. In vitro maintenance in hematopoietic stem cells. U. S. Patent. 2002:6,030.836.

20. Lagasse E., Connors H., Al-Dhalimy M., Reitsma M. et al. Purified Hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.* 2000;6:1229-1234.

21. Galli R., Borello U., Gritti A., Minasi M., et al. Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat. Neurosci.* 2000;3:986–991.

22. Ferrari G., Cusella-DeAngelis G., Coletta M., Paolucci E. et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998;279:1528–1530.

23. Greco R. et al. Immune monitoring in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: a survey from the EBMT-CTIWP / R. Greco, F. Ciceri, M. Noviello et al. // *Bone Marrow Transplantation*. 2018; 53(9): 1201—1205.

24. Strauer B. E., Kornowski R. Stem cell therapy in perspective. *Circulation*. 2003;107:929–934.

25. Orlic D., Hill J.M, Arai A.E. Stem cells for myocardial regeneration. *Circ. Res.* 2002;91:1092–1102.

26. Osawa M., Hanada K., Hamada H., Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 1996;273:242–245.

27. Genchi A., Brambilla E., Sangalli F., Radaelli M., Bacigaluppi M., Furlan



R., Andolfo A., Drago D., Magagnotti C., Scotti G.M., Greco R., Vezzulli P., Ottoboni L., Bonopane M., Capiluppo D, Ruffini F., Belotti D., Cabiati B., Cesana S., Matera G., Leocani L., Martinelli V., Moiola L, Vago L., Panina-Bordignon P., Falini A., Ciceri .F, Uglietti A., Sormani M.P., Comi G., Battaglia M.A., Rocca M.A., Storelli L., Pagani E., Gaipa G., Martino G. Neural stem cell transplantation in patients with progressive multiple sclerosis: an open-label, phase 1 study. *Nat Med.* 2023 Jan;29(1):75-85. DOI: 10.1038/s41591-022-02097-3. Epub 2023 Jan 9. PMID: 36624312; PMCID: PMC9873560.

28. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J.Ortho. Res.*1991;9:641-650.

29. Goshima J, Goldberg V, Paradis G. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J. Exp. Med.*2006;183:1797–1806.

30. Cheng L., Qasba P., Vanguri P. Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and pro-platelet formation from CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *J. Cell. Physiol.* 2000;184:58-69.

31. Albu S., Kumru H., Coll R., Vives J., Vallés M., Benito-Penalva J., Rodríguez L., Codinach M., Hernández J., Navarro X., Vidal J. Clinical effects of intrathecal administration of expanded Wharton jelly mesenchymal stromal cells in patients with chronic complete spinal cord injury: a randomized controlled study. *Cytotherapy.* 2021 Feb;23(2):146-156. DOI: 10.1016/j.jcyt.2020.08.008. Epub 2020 Sep 25. PMID: 32981857.

32. Wakatani S., Goto T., Pineda S., Young R. et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1994;76:579-592.

33. Kim Y.J., Ahn H.J., Lee S.H., Lee M.H., Kang K.S. Effects of conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in the skin immune response. *Biomed Pharmacother.* 2020 Nov;131:110789. DOI: 10.1016/j.biopha. 2020.110789. Epub 2020 Oct 23. PMID: 33152947.

34. Zhang W., Ling Q., Wang B., Wang K., Pang J., Lu J., Bi Y., Zhu D. Comparison of therapeutic effects of mesenchymal stem cells from umbilical cord and bone marrow in the treatment of type 1 diabetes. *Stem Cell Res Ther.* 2022 Aug 8;13(1):406. DOI: 10.1186/s13287-022-02974-1. PMID: 35941696; PMCID: PMC9358877

35. Lu J., Shen S.M., Ling Q., Wang B., Li L.R., Zhang W., Qu D.D., Bi Y., Zhu D.L. One repeated transplantation of allogeneic umbilical cord mesenchymal stromal cells in type 1 diabetes: an open parallel controlled clinical study. *Stem Cell Res Ther.* 2021 Jun 10;12(1):340. DOI: 10.1186/s13287-021-02417-3. PMID: 34112266; PMCID: PMC8194026.

36. Bushby K., Finke R., Birnkrant D.J., Case L.E., Clemens P.R., Cripe L., et al. DMD Care Considerations Working Group. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* 2010; 9(1):77–93. DOI: 10.1016/S14744422(09)70271-6. Epub 2009 Nov 27.

37. Lobyntseva G.S, Gladkikh Y.V., Lobyntsev D.V., Gladkikh V.Y. Human embryonal hemopoietic stem cells (Theory and clinical practice): *Naukova*



dumka:2004: 165 p.

38. Salas M.Q. et al. Impact of CD34+ cell dose on reduced intensity conditioning regimen haploidentical hematopoietic stem cell transplantation / M.Q. Salas, E.G. Atenafu, M.R. Bautista et al. //European J. of Haematology. 2019. Sep. 23. DOI: 10.1111/ejh.13332.