

Д.Ф. Глузман, д.м.н., профессор, Л.М. Скляренко, д.м.н., С.В. Коваль, к.б.н., Т.С. Иванивская, Н.И. Украинская, Л.Ю. Полудненко, Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, г. Киев

Нормальные и лейкемические стволовые кроветворные клетки

Многостадийный процесс нормального кроветворения, который завершается образованием циркулирующих в периферической крови эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, поддерживается содержащимися в костном мозге гемопоэтическими стволовыми клетками (ГСК). Основными свойствами ГСК являются способность к самообновлению, высокий пролиферативный потенциал, способность дочерних клеток к дифференцировке в клеточные элементы различных линий миело- и лимфопоэза.

Краткие исторические данные

Представление о существовании единой недифференцированной родоначальной лимфоцитоподобной клетки, общей для элементов миелоидного и лимфоидного ряда, было впервые сформулировано А.А. Максимовым в 1907 г. и положено в основу выдвинутой им унитарной теории кроветворения.

В историческом аспекте необходимо отметить работы по изучению родоначальных клеток гемопоэза и созданию «иерархических» моделей кроветворения учеников А.А. Максимова Bloot, Г.Ф. Ланга, а также В.П. Образцова, заложившего основы унитарной теории кроветворения в диссертации «К морфологии образования крови в костном мозге у млекопитающих» в 1880 г., за 37 лет до А. Раппенгейма. Важно подчеркнуть вклад в развитие теории кроветворения отечественных ученых А.Н. Крюкова, А.А. Заварзина, Н.Г. Хлопина, А.В. Румянцев, Н.Д. Стражеско, Д.Н. Яновского, А.Д. Тимофеевского, С.В. Беневоленского и др.

Реальное существование ГСК было экспериментально доказано в 1961 г. Till и McCulloch, которые открыли популяцию немногочисленных клоногенных клеток костного мозга, способную при трансплантации вызывать образование эритроидных, гранулоцитарных, мегакариоцитарных и смешанных колоний в селезенке детально облученных мышей. Вопросы, касающиеся механизмов дифференцировки родоначальных кроветворных клеток, интенсивно изучались И.Л. Чертковым, А.Я. Фриденштейном и их многочисленными учениками и последователями. В Украине исследование ГСК и их роли в лейкогенезе с использованием техники клонирования, приемов разделения клеток в изопикнических и изокинетических градиентах, методов электронной микроскопии и ультраструктурной цитохимии проводилось под руководством академика НАН Украины З.А. Бутенко.

Расширение знаний о нормальном кроветворении способствовало углублению представлений о механизмах лейкогенеза, привело к пониманию того, что возникновение лейкозов обусловлено наличием неопластических ГСК.

Первые описания клинических и морфологических признаков различных форм лейкозов были представлены учеными Donne, Craigie, Bennett, Virchow в 1842-1855 гг. В последующие десятилетия, благодаря совершенствованию методов диагностики, классификации лейкозов постоянно уточнялись, вводились новые нозологические формы, что в конечном итоге привело к созданию современной общепринятой классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) опухолевых заболеваний кроветворной и лимфоидной тканей. В основу классификации положена концепция о существовании клоногенной лейкемической стволовой клетки (ЛСК), определяющей возникновение тех или иных форм острых и хронических лейкозов и миелодиспластических синдромов (предлейкозов).

Впервые гипотеза о наличии стволовых клеток опухолей была высказана более

150 лет назад Virchow и Cohnheim. Результаты экспериментальных исследований *in vitro* и *in vivo*, проведенных в 1970-х гг., показали, что среди общей популяции лейкемических клеток встречаются редкие клетки, обладающие способностью к самоподдержанию, которые определяют экспансию лейкемического клона. Полагают, что ЛСК обладают рядом сходных с нормальными ГСК фенотипических и функциональных признаков, за исключением способности дифференцироваться в клетки различных линий гемопоэза. В популяциях нормальных ГСК и ЛСК используются одинаковые механизмы, которые обеспечивают их самоподдержание и стимулируют пролиферацию. Вместе с тем между ЛСК и нормальными ГСК существуют различия. Принципиальным в настоящее время является вопрос о том, могут ли формироваться ЛСК из нормальных ГСК или их ближайших потомков, которые наследуют или приобретают свойства нормальных ГСК, обеспечивающих, прежде всего, их способность к самоподдержанию.

В этой связи считаем возможным вначале остановиться на характеристике нормальных ГСК, лежащей в основе современной схемы кроветворения, и факторах, участвующих в их дифференцировке.

ГСК и нормальное кроветворение

Содержание ГСК в костном мозге человека невелико: 1 на 10⁶ миелокариоцитов (Wang et al., 1997). Развитие методов клонального анализа для клеток всех линий гемопоэза и доступность мультипараметрических проточных цитофлуориметров позволили получить фракции клеток, высоко обогащенных ГСК человека, изучить экспрессию на поверхностных мембранах клеток специфических антигенов и рецепторов, исследовать их функциональные свойства.

В процессе или после деления ГСК в костном мозге образуются две дочерние клетки, судьба которых определяется стохастически. Они могут сохранить свойства ГСК, подвергнуться апоптозу, остаться в костном мозге или мигрировать на периферию, приобрести способность к дифференцировке с образованием клеток-предшественников различных линий гемопоэза. Высоко обогащенные популяции полипотентных ГСК (ПГСК) включают субпопуляцию клеток, способных к длительной (на протяжении всей жизни) репопуляции кроветворения (ПГСК-ДЖ, long-term subset) с фенотипом Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD90⁺, и субпопуляцию клеточных элементов, способных поддерживать кроветворение на протяжении относительно короткого периода времени (ПГСК-КЖ, short-term subset). ПГСК-КЖ составляют основной пул ПГСК в костном мозге взрослого человека, в эмбриональной печени преобладают ПГСК-ДЖ. ПГСК-КЖ дифференцируются в мультипотентные клетки-предшественники (МПКП), способные к кратковременному самоподдержанию. По цитоморфологическим признакам МПКП, как и ГСК, напоминают лимфоциты.

МПКП (с фенотипом у мышей Lin^{low}-skit⁺Thy1.1⁺Sca-1⁺Flk-2⁻), проходя функционально необратимые стадии созревания, дают начало олиголинейным клеткам-предшественникам.

У мышей до настоящего времени идентифицированы 2 типа олиголинейных клеток-предшественников. Один из них — общий предшественник лимфоцитов (ОПЛ), дающий начало возникновению Т-лимфоцитов, естественных клеток-киллеров и В-лимфоцитов. Второй — общий предшественник миелопоэза (ОПМ), дающий начало гранулоцитарно-моноцитарным предшественникам (ГМП), дифференцирующимся в моноциты/макрофаги и гранулоциты, и мегакариоцитарным/эритроцитарным предшественникам (МЭП), в результате дифференцировки которых в конечном итоге вырабатываются мегакариоциты/тромбоциты и эритроциты. Из ОПЛ и ОПМ возникают также дендритные клетки, соответственно, лимфоидного и миелоидного типа.

Важно отметить, что соответствующие классы (отделы) ГСК и клеток-предшественников нашли отражение в оригинальной отечественной схеме кроветворения И.Л. Черткова и А.И. Воробьева, впервые опубликованной в 1973 г., когда еще не была создана гибридомная технология, не были получены моноклональные антитела к линейно-специфическим и дифференцировочным антигенам кроветворных клеток и не существовало проточных цитофлуориметров и клеточных сортеров. В последующем (в 1995 г. и 2005 г.) данная схема совершенствовалась, в нее вносились дополнения и уточнения.

В настоящее время эта получившая широкое признание схема кроветворения включает отделы стволовых тотипотентных клеток, стволовых мультипотентных клеток, полиолигопотентных коммитированных предшественников, моноолигопотентных коммитированных предшественников, морфологически распознаваемых blastных клеток.

Схема кроветворения И.Л. Черткова и А.И. Воробьева относится к классическим моделям гемопоэза. Ключевой постулат этой модели: линейной коммитации ПГСК предшествует утрата способности к самоподдержанию в процессе дифференцировки. Другой критический постулат: наиболее ранним событием коммитации является разделение лимфоидных и миелоидных линий, что подтверждается наличием ОПЛ и ОПМ, каждый из которых проходит дальнейшие этапы коммитации.

Авторы альтернативной myeloid-based модели (Kawamoto et al., 2010) установили, что прежде всего происходит дивергенция ГСК на общий миелоидно/эритроидный предшественник (ОМЭП) и общий миелоидно/лимфоидный предшественник (ОМЛП). ОПЛ в этой модели кроветворения отсутствует. ОМЛП затем производит предшественники Т- и В-клеток через промежуточную стадию биопотенциальных клеток, соответственно, миелоидных/Т-предшественников и миелоидных/В-предшественников. Таким образом, миелоидный потенциал сохраняется в Т- и В-клеточных линиях даже после их дивергенции.



Д.Ф. Глузман

Клиническим подтверждением данной модели может быть существование острых лейкозов со смешанным фенотипом: В-/миелоидного и Т-/миелоидного.

Основными свойствами ГСК являются способность к самоподдержанию и высокий пролиферативный потенциал, достаточный для мультилинейного восстановления кроветворения после облучения, действия цитостатиков при наличии генетических повреждений (Дризе, 2005; 2009). Применение подобных методов при изучении ГСК у человека невозможно. Поэтому приходится использовать другие подходы, в частности, восстановление кроветворения у иммунологически скомпроментированных животных (мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом). Проллиферативный потенциал ГСК, способных примерно к 50 клеточным делениям и поддерживающих продукцию кроветворных клеток в течение всей жизни человека, обеспечивается функционированием генов Bmp, Vmi-1, Notchbox-4, Wnt и др. Более детальную картину оркестровки генов в ходе дифференцировки кроветворных клеток различных линий представить пока не удастся. Однако можно надеяться, что в ближайшие годы будут получены новые данные, которые позволят рассматривать схему кроветворения с учетом экспрессии различных генов, функционирования цитокинов и рецепторов на мембранах гемопоэтических клеток и клеток стромального микроокружения.

Первым маркером, который был использован для получения фракции, обогащенной ГСК, был антиген CD34. Его экспрессия отмечается на поверхностных мембранах менее чем 5% кроветворных клеток. Антиген CD34 в качестве маркера в последние годы широко используется в клинических исследованиях при трансплантации ГСК. Иммунофенотип полипотентных ГСК в норме представлен в ряде работ (Weissman et al., Dick et al.) — CD34⁺CD38⁻CD90⁺CD123⁻CD117⁻CD45RA⁻CD49f⁻. Иммунофенотип клеток-предшественников представлен в современной модели гемопоэза человека: мультипотентной клетки-предшественника CD45⁺CD90⁺CD49f⁻, общего предшественника миелопоэза — CD45RA⁻CD135⁺CD10⁻CD7⁻, клетки-предшественника гранулоцитов/моноцитов — CD45⁺CD135⁺CD10⁻CD7⁻, клеток-предшественников мегакариоцитов/эритроцитов — CD45RA⁺CD135⁻CD10⁻CD7⁻, незрелых лимфоидных клеток-предшественников — CD45RA⁺CD10⁻CD7⁻.

Особый интерес при изучении биологии ГСК представляют молекулярные механизмы, регулирующие баланс между их самоподдержанием и дифференцировкой.

Изменения экспрессии генов при дифференцировке ГСК часто сопровождаются эпигенетическими изменениями в регуляторных регионах генов. Состоянием ГСК ассоциирован ряд факторов транскрипции, включая гены ID, SOX8, SOX18, NFIB. Регуляция генов MYC и IKZF1 происходит при дифференцировке ГСК в мультипотентные клетки-предшественники.

К числу наиболее интенсивно исследуемых факторов транскрипции относятся НохВ4, регулирующий функции ГСК человека, HLF и HES1, гиперэкспрессия которых увеличивает репопуляционный потенциал ГСК. В поддержании функции ГСК человека важную роль играет CCN3 (NOV) – внеклеточный модулятор сигнального пути Notch.

Подавляющее большинство человеческих ГСК в норме находятся в состоянии покоя (фаза G0 клеточного цикла). Полагают, что это является своеобразным защитным механизмом, ограничивающим аккумуляцию повреждений ДНК.

Цитохимия кроветворных клеток-предшественников

Распознаваемые с помощью обычного светового микроскопа кроветворные клетки включают дифференцирующиеся, созревающие и зрелые клетки всех клеточных ростков гемопоэза. Как показали результаты проведенных нами исследований, созревающие и зрелые клетки всех клеточных ростков гемопоэза. Как показали результаты проведенных нами исследований, наиболее дифференцируемые морфологически идентифицируемые бластные клетки различного происхождения имеют характерные линейно-специфические цитохимические особенности. Для миелобластов таковыми являются положительная реакция при выявлении миелопероксидазы и хлоратетатэстеразы, для монобластов – высокая активность кислой неспецифической эстеразы, для мегакариобластов – положительная реакция при определении активности ацетилхолинэстеразы. Были установлены также различия между В- и Т-лимфоцитами при цитохимическом выявлении активности кислой фосфатазы. Нам удалось установить, что приведенные в дополненной классической схеме гемопоэза морфологически нераспознаваемые кроветворные клетки-предшественники IV-V классов, как и их лейкозотрансформированные аналоги, обладают маркерными цитохимическими признаками, присущими зрелым клеткам того или иного ростка гемопоэза.

Таким образом, удалось подтвердить данные ранее проведенных в нашем отделе исследований по цитологической и цитохимической характеристике кроветворных клеток-предшественников. Они основывались на изучении низкокодифференцированных кроветворных клеток в желточном мешке, печени и костном мозге в эмбриональном периоде, в отдельных фракциях миелокариоцитов, полученных при дифференциальном центрифугировании в градиенте плотности различных соединений; клеток, появившихся в числе первых при регенерации костномозгового кроветворения после аплазии, которая была вызвана действием лучевой терапии или цитостатических препаратов. Учитывались также результаты изучения клеток с цитоморфологическими признаками бластов на ранних стадиях развития селезеночных колоний разного типа (эритроидных, гранулоцитарных, мегакариоцитарных, смешанных) у летально облученных мышей после внутривенной трансплантации костного мозга. Эти данные наряду с результатами биохимических исследований клеток крови в норме и при лейкозах (И.Ф. Сейц, И.С. Луганова, 1967) послужили теоретической основой для использования цитохимических методов в диагностике различных форм острых и хронических лейкозов миелоидного и лимфоидного происхождения, которые ранее применялись эмпирически.

Предполагается, что возможные механизмы стохастической коммитации ГСК и кроветворных клеток-предшественников могут быть следующими. Первый – рандомизированное ограничение потенциала олиголинейных клеток-предшественников. Второй заключается в том, что ГСК могут воспроизводить себя (самообновление) или подвергаться рандомизированной коммитации в результате

активации группы дифференцировочных генов в клетках только одной линии.

Происходят эти процессы в соответствующих участках костного мозга (линейно-специфических анатомических нишах) вблизи поверхности эндоста с участием мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

Популяция МСК, или стромальных клеток костного мозга, мультипотентна и способна дифференцироваться в остеобласты, хондроциты, адипоциты, фибробласты и другие типы клеток, формирующие нишу эндоста. Многочисленные молекулы, секретируемые этими клетками, регулируют количество и функции ГСК путем сложной сигнальной сети (И.Л. Чертков, Н.И. Дризе, А.И. Воробьев, 2006; С.А. Луговская, Г.И. Козинец, 2009; В.Т. Морозова, 2012). В настоящее время активно обсуждается вопрос о существовании подобной ниши для ЛСК.

Лейкемогенез. Фенотип ЛСК при острых миелоидных лейкозах

Экспериментальные доказательства существования ЛСК при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) были впервые получены Lapidot с соавт. (1996) и подтверждены рядом других исследователей. Полагают, что крайне немногочисленные ЛСК, обнаруживающиеся в общей популяции лейкоэмических клеток, обладают сходными с нормальными ГСК свойствами, но не способны дифференцироваться в клетки различных линий. ЛСК, подобно нормальным ГСК, дают начало дочерним клеткам-предшественникам, утрачивающим способность к самообновлению и превращающимся в лейкоэмические бласты. В основе лейкоэмической трансформации ГСК или их ближайших потомков лежат приобретенные мутации. Линейная принадлежность лейкоэмических клеток и уровень их дифференцировки определяются с помощью иммунофенотипических маркеров.

До настоящего времени рассматривались две основные модели лейкемогенеза. Согласно стохастической модели, лейкоз представлен гомогенной популяцией незрелых клеток, из которых лишь немногие способны к самообновлению и пролиферации. В отличие от этого иерархическая модель лейкемогенеза предполагает, что лейкоз – это гетерогенная популяция клеток, среди которых только небольшой процент ЛСК генерирует лейкоэмические клоны. Недавно была предложена третья модель развития заболевания. В отличие от первых двух, соответственно которым только немногочисленные недифференцированные клетки ответственны за возникновение и поддержание патологического процесса, третья модель предполагает, что зрелые клетки вновь приобретают способность к самообновлению. Это позволяет рассматривать лейкоз как заболевание, при котором фенотипически зрелые и незрелые неопластические клетки, характеризующиеся генетической нестабильностью, пролиферируют и образуют лейкоэмические клоны с селективной способностью к распространению, основанной на их пролиферативных свойствах и способности к выживанию. Экспериментальные доказательства существования клоногенных ЛСК были получены в 1996 г. в опытах по гетеротрансплантации на мышах с выраженным комбинированным иммунодефицитом (SCID) и мышам с NOD/SCID. Последние были получены путем скрещивания нетучных диабетических мышей (NOD) и мышей с SCID. Мыши первой категории не имеют В- и Т-лимфоцитов, а у вторых не определяется активность естественных киллеров и имеются другие признаки иммунодефицита – дефекты активности макрофагов и активации комплемента.

При трансплантации мышам лейкоэмических клеток костного мозга больных

различными формами ОМЛ (кроме острого промиелоцитарного лейкоза, ОМЛ М3) было показано, что клональными свойствами обладали лишь ЛСК, содержащиеся во фракциях CD34⁺CD38⁻ или CD34⁺CD38^{+/low} клеток, доля которых среди бластных клеток у больных ОМЛ составляет 0,1-1%. Эти клетки, получившие название NOD/SCID-лейкоз-иницирующие клетки (SL-ICs), после пересадки второму и третьему поколению идентичных мышей приживались и индуцировали лейкоз. Пока не идентифицированы маркеры, позволяющие различать коротко- и длительноживущие SL-ICs.

В ряде исследований показано, что нормальные ГСК и ЛСК имеют ряд общих маркеров поверхностных мембран и отличаются по экспрессии других антигенов. Так, на нормальных ГСК и ЛСК экспрессируются антигены CD34, CD71 и HLA-DR. В то же время антигены Thy-1 (CD90) и c-kit (CD117) экспрессируются на ГСК в норме и не выявляются на ЛСК. Антиген CD123 (α-субединица рецептора ИЛ-3) экспрессируется на ЛСК и не обнаруживается на ГСК в норме. Следует отметить, что в ряде случаев могут быть успешно пересажены и инициируют лейкоз у мышей цитогенетически аномальные ЛСК, обнаруживаемые у некоторых больных ОМЛ в популяции CD34⁺CD90⁺ клеток и крайне редко CD34⁺ клетки.

Исследования на мышах NOD/SCID показали, что подобно нормальному гемопоэзу ОМЛ имеют иерархическую организацию, которая инициируется и поддерживается ЛСК и дает начало коротко и длительно живущим SL-ICs, обладающим репопулирующими свойствами. Последние, в свою очередь, приводят к появлению клеток с аномальными дифференцировочными программами и выработке бластов и аномально дифференцированных лейкозных клеток. В то же время недавно было установлено, что клетки, экспрессирующие маркеры зрелых миелоидных клеток (CD33 или CD13), могут функционировать в качестве SL-ICs. Тем самым остается открытым вопрос, может ли экспрессия поверхностных маркеров определять функционирование клеток как стволовых. Эти данные согласуются с результатами исследований, в которых было показано, что коммитированные клетки-предшественники и зрелые клетки, не обладающие способностью к самоподдержанию, могут быть мишенями для лейкоэмической трансформации. Например, активация промоторных элементов ряда миелоидно-специфических генов человека (таких как MRP8, C11b или катепсина G) индуцирует лейкоз человека на трансгенных мышных моделях. Недавно было показано, что слитный ген лейкозов MLL-ENL, образующийся в результате транслокации t(11;19), индуцирует тот же тип лейкоза при трансдукции в ГСК, ОМП или клетки-предшественники гранулоцитов/макрофагов. Подобным образом слитный ген MOZ-TIF2 участвует в лейкоэмической трансформации как ГСК, так и коммитированных миелоидных клеток-предшественников. Таким образом, активация соответствующего онкогена в зрелой кроветворной клетке может приводить к ее трансформации в ЛСК, обладающую способностью к самообновлению. В то же время при использовании другого партнера слитного гена MLL-GAS7 было установлено, что к возникновению смешанно линейных лейкозов у мышей ведет трансдукция только мышных ГСК, но не ОМП или клеток-предшественников гранулоцитов/макрофагов. Таким образом, возникают сомнения в существовании универсального фенотипа ЛСК и не исключаются вариации в экспрессии антигенов поверхностной мембраны ЛСК у отдельных больных с одной и той же формой лейкоза.

Задача идентификации специфических генов и поверхностных маркеров, экспрессируемых ЛСК, представляется

крайне трудной. ЛСК, скорее, могут быть охарактеризованы функционально, чем по фенотипу, и должны рассматриваться как лейкозиницирующие клетки. Не ясно, отражают ли работы, проводимые с использованием мышных моделей SCID и NOD/SCID, физиологию и/или патологические процессы, происходящие в организме человека. Пока на основе этих исследований можно сделать вывод, что способность трансформированных клеток, независимо от их фенотипа и функционирования в организме мышей с иммунодефицитом, инициировать и поддерживать развитие лейкоза у человека является наиболее важным биологическим признаком ЛСК.

Фенотип ЛСК при хроническом миелолейкозе

Хронический миелолейкоз (ХМЛ) является клональным процессом, возникающим в результате трансформации ГСК костного мозга, ассоциированным с наличием слитного гена BCR-ABL. ХМЛ в своем развитии проходит три фазы (хроническую, акселерационную и бластную кризу). В процессе трансформации, сопровождающейся развитием бластной кризы, могут обнаруживаться изменения в генах TP53, RB1, MYC, p16/NK4a (CDKN2A), RAS, AML1 и ENV1. У 70% больных при бластной кризе ХМЛ лейкоэмические клетки имеют миелоидную природу, а у остальных – лимфоидную. При ХМЛ выявлены, по крайней мере, два типа клеток, способных к самоподдержанию: примитивные ГСК с мутациями BCR-ABL, ответственные за выработку незрелых и зрелых миелоидных клеток в хронической фазе заболевания, и популяция гранулоцитарно-макрофагальных клеток-предшественников (ГМП), приобретающих присущую стволовым клеткам способность к самоподдержанию в стадии бластной кризы. При гетеротрансплантации клеток больных ХМЛ в хронической фазе заболевания мышам NOD/SCID транскрипты BCR-ABL обнаруживаются в клетках всех линий миелопоэза, В-лимфоцитах и не определяются в Т-лимфоцитах. ГМП при ХМЛ в фазе бластной кризы (CD34⁺CD38⁻Lin⁻) также способны индуцировать лейкоз при гетеротрансплантации мышам с выраженным комбинированным иммунодефицитом. В этих ЛСК второго типа отмечается активация Wnt/β-катенин сигнального пути, играющего важную роль в самоподдержании стволовых клеток и снижении экспрессии гена Jun B вследствие его дерегуляции, вызванной фактором транскрипции (MDF1).

Молекулярные механизмы, регулирующие самообновление нормальных ГСК и ЛСК

Интенсивно изучается ряд генов, факторов транскрипции, регуляторов клеточного цикла, модулирующих самообновление, пролиферацию и дифференцировку ГСК. Такие гены, как SCL, GATA-2, LMO-2 и AML1 (известны также как CBFA2 и RUNX1), управляют регуляцией транскрипции на ранних стадиях гемопоэза. Дерегуляция этих генов в результате хромосомных аббераций играет ключевую роль в лейкемогенезе. Так, ген SCL, кодирующий соответствующий фактор транскрипции, является наиболее частой мишенью хромосомных перестроек у детей с Т-клеточным лимфобластным лейкозом (Т-ОЛЛ). Ген SCL в норме экспрессируется в ГСК и клетках-предшественниках, его активация может индуцировать процесс злокачественной трансформации. Аномальная активация гена AML1 в результате транслокации t(8;21) и образование слитного гена AML-ETO, индуцирующего самообновление стволовой клетки, приводит к развитию лейкоза.

В регуляции самообновления и дифференцировки ГСК играют роль такие

Продолжение на стр. 42.

Д.Ф. Глузман, д.м.н., профессор, Л.М. Скляренко, д.м.н., С.В. Коваль, к.б.н., Т.С. Ивановская, Н.И. Украинская, Л.Ю. Полудненко, Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, г. Киев

Нормальные и лейкоэмические стволовые кроветворные клетки

Продолжение. Начало на стр. 40.

факторы транскрипции, как гены Homeobox (Hox), включая HoxB4. Ген HoxB4 интенсивно экспрессируется в ГСК, играет важную роль в их экспансии. При ОМЛ, как правило, наблюдается нарушение регуляции экспрессии HoxA9 – одного из генов семейства Hox.

Wnt-сигнальный путь играет важную роль в регуляции функций ГСК и кроветворных клеток-предшественников. Его активация увеличивает экспрессию таких факторов транскрипции и регуляторов клеточного цикла, как HoxB4 и Notch-1.

Notch/Jagged путь модулирует внеклеточные регуляторные сигналы, контролирующую судьбу ГСК. Члены семейства Notch играют критическую роль в поддержании ГСК в недифференцированном состоянии и могут действовать как сдерживающие сигналы для факторов, управляющих самообновлением и линейной коммитацией. Установлено, что ген, кодирующий рецептор Notch, подвергается реаранжировке при хромосомных транслокациях у больных Т-ОЛЛ. Факторы транскрипции и регуляторы клеточного цикла, такие как Bmi-1 и Sonic hedgehog (Shh), ассоциированы с онкогенезом, регулируют пролиферацию ГСК и ЛСК. Bmi-1, член семейства Polycomb, экспрессируется в нормальных ГСК и ЛСК и регулирует их самообновление, модулируя активность генов, управляющих пролиферацией, выживаемостью и линейной коммитацией. Несмотря на отсутствие прямых доказательств, роль Shh в комбинации с различными факторами роста в регуляции самообновления ГСК подтверждена в опытах in vitro. С ограничением активации ГСК, выбором

линейной коммитации и предотвращением лейкогенеза ассоциируется PTEN-негативный регулятор фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K). Зависимость от PTEN отличает ГСК от ЛСК.

Фенотип ЛСК при острых лимфоидных лейкозах

В ранее проведенных исследованиях было показано, что к воспроизведению ОЛЛ у иммунодефицитных мышей после внутривенной трансплантации способны только незрелые клетки с фенотипом CD34⁺CD19⁻. Позднее появились данные о том, что свойствами ОЛЛ-иницирующих клеток обладает более зрелая субпопуляция CD34⁺CD19⁺ лейкоэмических бластов. Подобные ЛСК были обнаружены при ОЛЛ «общего типа» с транслокацией t(12;21). В то же время кандидаты в ЛСК CD34⁺CD19⁻ определялись при двух типах заболевания высокого риска – при ОЛЛ у новорожденных с t(4;11) и у взрослых больных с Ph⁻-ОЛЛ, характеризующимся t(9;22). Результаты опытов по серийной транслокации показали, что лимфоидные ЛСК человека с более зрелым фенотипом также способны воспроизводить лейкоз ОЛЛ из В-клеток-предшественников. По данным Kong и соавт. (2008), лейкоэмизирующие клетки были обнаружены как среди CD34⁺CD38⁺CD19⁺ бластов, так и в субпопуляции CD34⁺CD38⁻CD19⁺ клеток.

Таким образом, лимфоидные ЛСК, подобно их миелоидным аналогам, являются достаточно гетерогенными. Подтверждением служат результаты молекулярно-генетических исследований. Клинически и генетически различные подтипы ОЛЛ возникают в результате транслокации,

происходящей на определенных стадиях развития лимфоидных клеток. Так, трансформированные лейкоэмизирующие стволовые клетки с фенотипом коммитированных В-клеток-предшественников при P190 и P210 BCR-ABL ОЛЛ лежат в основе развития различных биологических и клинических форм заболевания. Подобным же образом коммитированными В-клетками-предшественниками представлены ОЛЛ у детей со слитным геном ETV6-RUNX1 (TEL-AML1). При установлении диагноза ОЛЛ и выявлении рецидивов было также показано существование ряда генетически отличающихся субклонов ЛСК, подвергающихся эволюции в течении заболевания.

Взаимодействие между ЛСК и нишами костного мозга

Подобно нормальным ГСК ЛСК находятся в нишах костного мозга в покоящемся состоянии и защищены от цитотоксического воздействия химиотерапевтических агентов. На модели иммунодефицитных мышей было показано, что CD34⁺CD38⁻ ЛСК при ОМЛ заселяют и приживаются в богатой остеобластами зоне эндоста. Совместное культивирование лейкоэмических бластов или ЛСК с МСК (суррогатная модель ниши) приводило к повышению устойчивости клеток к химиотерапии. Важную роль в этом играют механизмы адгезии между ЛСК и нишами костного мозга с участием антигена CD44. Использование CD44 в качестве мишени может способствовать эрадикации миелоидных ЛСК человека. Изучение механизмов взаимодействия между нишей и ЛСК послужит основой для разработки более эффективной стратегии лечения больных лейкозами.

Терапия, направленная против ЛСК

Основная цель изучения лейкоэмизирующих клеток – излечение больных прежде всего с ОМЛ на более длительный период путем разработки стратегии, которая позволила бы добиться эрадикации ЛСК. В качестве одного из подходов может быть использовано воздействие на молекулярные мишени – белки и сигнальные пути, важные для выживания ЛСК и не оказывающие влияния на нормальные ГСК. Эффективным в эрадикации ЛСК, как показывают опыты на моделях у животных, может быть комбинированное ингибирование двух специфических путей. Первый из них включает индукцию оксидативного стресса в комбинации с ингибированием ядерного фактора κВ (NF-κB), в физиологических условиях передающего сигналы выживания. Успешно ингибировать эти два процесса и приводить к избирательному апоптозу ЛСК in vitro и in vivo может ингибитор протеасом MG-132. Предклинические испытания проходят также препарат растительного происхождения партенолид.

Другой подход – влияние на процесс адгезии между ЛСК и их нишами в костном мозге с целью мобилизации покоящихся ЛСК и их освобождения от защитного действия микроокружения. С этой целью могут быть использованы Г-КСФ и антагонисты CXCR4. Сделать резистентные ЛСК чувствительными к химиотерапии можно с помощью агентов, вызывающих их переход из состояния покоя G0 в фазу S-клеточного цикла.

Необходимы дальнейшие усилия для изучения биологии ЛСК и преодоления их резистентности к терапии.

Анкета читателя

Здоров'я України

Для получения тематического номера газеты заполните анкету и отправьте по адресу:

«Медицина газета «Здоров'я України»,
ул. Народного ополчения, 1, г. Киев, 03151

Укажите сведения, необходимые для отправки тематического номера «Онкология»

Фамилия, имя, отчество

Специальность, место работы

Индекс

город

село

район область

улица дом

корпус квартира

Телефон: дом

раб.

моб.

E-mail:

Нам важно знать Ваше мнение!

Понравился ли Вам тематический номер «Онкология»?

Назовите три лучших материала номера

1.

2.

3.

Какие темы, на Ваш взгляд, можно поднять в следующих номерах?

Публикации каких авторов Вам хотелось бы видеть?

Хотели бы Вы стать автором статьи для тематического номера «Онкология»?

На какую тему?

Является ли для Вас наше издание эффективным для повышения врачебной квалификации?

* Я добровольно передаю указанные в анкете персональные данные ООО «Здоровье Украины». Я даю согласие на их использование для получения от компании (связанных с ней лиц, коммерческих партнеров) изданий, информационных материалов, рекламных предложений, а также на внесение моих персональных данных в базу данных компании с неограниченным во времени хранением этих данных.

Подпись