

РЕГЕНЕРАЦИЯ И КАНЦЕРОГЕНЕЗ

А.В. Печерский¹, В.И. Печерский, А.Б. Смолянинов², В.Н. Вильянинов³,

Ш.Ф. Адылов², А.Ю. Шмелёв¹, О.В. Печерская¹, В.Ф. Семиглазов⁴

¹Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия; ²Покровский банк стволовых клеток, Санкт-Петербург, Россия; ³Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия; ⁴НИИ онкологии им. профессора Н.Н. Петрова, Санкт-Петербург, Россия.

Введение. После 40 лет у людей наблюдается снижение пула плюрипотентных стволовых клеток и повышение риска развития онкологических заболеваний.

Материалы и методы. В первой части исследование проводилось у 11 больных раком почки, мочевого пузыря, предстательной железы III-IV стадии заболевания в возрасте от 54 до 76 лет. Во второй части исследование проводилось у 4-х пациентов 60-82 лет, которым в целях восстановления регенерации было проведено от 4 до 7 переливаний мононуклеарной фракции периферической крови от молодых доноров 19-23 лет.

Результаты. В первой части исследования через 1 месяц после проведения химиотерапии или таргетной терапии у всех 11 онкологических больных развивалась лейкопения, сопровождавшаяся увеличением содержания FGFb в крови в среднем в 1,74 раза. У 4-х пациентов из них наблюдалось увеличение уровня human VEGF-A в среднем в 1,25 раза, у 3-х пациентов - увеличение уровня human EGF в среднем в 1,13 раза. Во второй части исследования у 4-х пациентов через 3-6 месяцев после завершения курса из 4-7 трансфузий мононуклеарной фракции периферической крови содержание ГКП CD34⁺ периферической крови увеличилось в среднем в 3,25 до уровня молодых лиц, а уровень FGFb уменьшился в среднем в 1,78 раза. У 2-х пациентов из них уровень human VEGF-A уменьшился в среднем в 1,48 раза, у 3-х пациентов уровень human EGF уменьшился в среднем в 4,12 раза. В буккальном эпителии у всех 4-х пациентов экспрессия p53 снизилась в среднем в 6,02 раза, у 3-х из них - экспрессия Bcl-2 снизилась в среднем в 60,0 раз.

Заключение. Нарушение обновления тканей является основной причиной развития канцерогенеза у людей старше 40 лет. Избыточную стимуляцию митотической активности у них можно снизить до нормального уровня посредством восстановления численности пула плюрипотентных стволовых клеток при переливании мононуклеарной фракции периферической крови от молодых доноров 18-23 лет одних с реципиентом групп крови и пола (патент РФ № 2350340).

Ключевые слова: регенерация, канцерогенез, плюрипотентные стволовые клетки, тестостерон, AR, FGFb, Bcl-2, p53.

Введение

После 40 лет у людей наблюдается уменьшение пула плюрипотентных стволовых клеток [1], приводящее к атрофии и фиброзным изменениям во всех тканях и органах, а также повышение риска развития онкологических заболеваний [2, 3, 4]. Изучение связи между нарушением обновления тканей и канцерогенезом представляет значительный интерес.

Цель исследования – изучение причин и способа нормализации повышенной митогенной стимуляции у людей старше 40 лет.

Материалы и методы

Изучение зависимости митогенной стимуляции от изменения обновления тканей (регенерации) у людей старше 40 лет проводилось на примере усугубления имеющихся нарушений регенерации у онкологических пациентов, получавших химиотерапию / таргетную терапию, и на противоположном примере восстановления регенерации у пациентов старше 50 лет при проведении им трансфузий моноклеарной фракции периферической крови от молодых доноров 19-23 лет. И в первом и во втором случае изменения митогенной стимуляции происходили за относительно короткий промежуток времени, что позволило связать их с усугублением нарушения регенерации или, напротив, с восстановлением регенерации.

В первом случае митогенные факторы – клеточные факторы роста определялись у 11 больных раком почки, мочевого пузыря, предстательной железы III - IV стадии заболевания в возрасте от 54 до 76 лет до и через 1 месяц после начала химиотерапии или таргетной терапии. Поскольку плюрипотентные стволовые клетки участвуют в обновлении всех тканей организма [4], то при подавлении пула стволовых клеток при проведении химиотерапии / таргетной терапии (подтверждённого развитием лейкопении) у всех у пациентов происходило нарушение обновления тканей (нарушение регенерации). Критериями включения в основную группу были: проведение пациентам химиотерапии или таргетной терапии по поводу различных онкологических заболеваний, возраст пациентов, превышающий 50 лет. Контрольную группу составили 11 практически здоровых доноров крови в возрасте от 18 до 23 лет. Критериями их отбора были: практически здоровые люди в возрасте от 18 до 25 лет.

Во втором случае митогенные факторы – клеточные факторы роста определялись у 4-х пациентов 60 - 82 лет, которым в целях восстановления процесса обновления тканей (восстановления регенерации) было проведено от 4 до 7 переливаний моноклеарной фракции периферической крови от молодых доноров 19 – 23 лет с промежутками в 2 – 3 месяца.

Критериями включения в основную группу были: возраст пациентов старше 50 лет и осуществление им трансфузии аллогенной моноклеарной фракции периферической крови в целях восстановления регенерации. Заготовка моноклеарной фракции периферической крови для каждого из 4-х реципиентов производилась от одного молодого донора 19-23 лет. Критериями подбора доноров были: соответствие состояния здоровья требованиям Приказа МЗ РФ от 14 сентября 2001 г. № 364 «Об утверждении порядка медицинского обследования доноров крови и ее компонентов», возраст 18 – 23 лет, одинаковые с реципиентами пол и антигенные системы АВ0, Rh-фактор, фенотип Rh-фактора, Kell (патент РФ № 2350340). При Kell (+) переливание осуществлялось от донора с Kell (-). Контрольную группу составили 4 практически здоровых донора крови в возрасте от 19 до 22 лет. Критериями включения в контрольную группу были: практически здоровые люди в возрасте от 18 до 25 лет.

Оценка эффективности терапии, направленной на восстановление регенерации, осуществлялась на основании определения количества гемопоэтических клеток-предшественников (ГКП) CD34⁺ периферической крови. Дополнительно после получения согласия больных под местной анестезией проводился забор биоптатов слизистой оболочки полости рта для гистологического и иммуногистохимического исследования. Выбор буккального эпителия был случайным, обусловленным простотой забора материала. Изменения в буккальном эпителии трактовались, как отражение общих изменений в тканях у наблюдаемых пациентов, получавших трансфузии моноклеарной фракции периферической крови.

Заготовка донорской моноклеарной фракции периферической крови производилась на клеточном сепараторе Amicus с использованием специфической одноразовой стерильной расходной системы Amicus MNC-Kit. При первом переливании с целью формирования химеризма для минимизации антигенной нагрузки производился редуцированный забор моноклеарной фракции

периферической крови - 5 циклов сепарации (ориентировочный объем интраоперационно обработанной крови донора – 1500 мл). Для последующих переливаний, осуществляемых с целью восстановления обновления тканей (восстановления регенерации), моноклеарная фракция периферической крови получалась путём проведения 15 циклов сепарации при аппаратной обработке 4600 ± 100 мл крови донора. Осаждение эритроцитов проводилось с использованием 20 мл раствора гемокорректора «Стабизол». Перед забором моноклеарной фракции периферической крови доноры проходили стандартное обследование. В течение 5 дней до проведения операции донорского лейкоцитозера производилась подготовка доноров. Донорам – мужчинам с массой тела в среднем 75 кг подкожно вводился филгастрим (фирменное название – нейпомакс) в дозе 78 млн ЕД / 30 + 48 млн ЕД (780 мкг / 300 + 480 мкг) один раз в день, ежедневно, в течение 5 дней. Для женщин, имевших меньшую массу тела, чем мужчины (в среднем 60 кг), доза филгастрима (нейпомакса) составляла 60 млн ЕД / 30 + 30 млн ЕД (600 мкг / 300 + 300 мкг) один раз в день, ежедневно, в течение 5 дней. Последнее введение филгастрима производилось в день сепарации. В конце переливания моноклеарной фракции периферической крови пациентам внутривенно однократно вводился преднизолон в дозе 50 мг для уменьшения выраженности посттрансфузионных реакций. Начиная с первых часов после переливания пациентам – мужчинам с массой тела в среднем 80 кг подкожно вводился филгастрим (нейпомакс) 78 млн ЕД / 30 + 48 млн ЕД (780 мкг / 300 + 480 мкг) один раз в день, ежедневно в течение 10 дней. Для женщин с массой тела в среднем 60 кг доза филгастрима (нейпомакса) составляла 60 млн ЕД / 30 + 30 млн ЕД (600 мкг / 300 + 300 мкг) один раз в день, ежедневно в течение 10 дней. Введение колониестимулирующего фактора (филгастрима) проводилось с целью преодоления перелитыми моноклеарными лейкоцитами точки рестрикции при их попадании в чужеродную среду крови реципиента, а также для последующей стимуляции их деления и увеличения их числа. Дополнительно с этой же целью пациенту назначался метилурацил 0,5 по 1 таблетке четыре раза в день в течение 1 месяца.

Методы исследования. Определение гемопоэтических клеток-предшественников (ГКП) CD34⁺ периферической крови проводилось методом проточной цитометрии

на проточном цитометре FC500 с использованием набора Stem-Kit Reagents, Beckman Coulter Company (Франция). Чувствительность метода определения концентрации ГКП CD34⁺ периферической крови составила 0,5 кл/мкл. Коэффициент вариации составил 10,7%.

Иммуноферментные исследования. Определение человеческого фактора роста фибробластов, основной формы (FGFb) в сыворотке крови осуществлялось тест-набором фирмы R&D Systems, Inc., чувствительность метода – 3,0 пг/мл, коэффициент вариации - 5,3 %. Определение человеческого васкулоэндотелиального фактора роста А (VEGF-A) осуществлялось тест-набором фирмы Bender MedSystems, чувствительность метода – 7,9 пг/мл, коэффициент вариации - 6,2 %. Определение эпидермального фактора роста человека (human EGF) осуществлялось тест-набором фирмы Bender MedSystems, чувствительность метода – 0,26 пг/мл, коэффициент вариации – 3,5 %.

Морфологические исследования. Кусочки слизистой полости рта фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина, проводили через спирты и заливали в парафин по стандартной методике приготовления гистологических препаратов [5]. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали обзорными красителями (гематоксилином и эозином).

Иммуногистохимические исследования. Определение экспрессии андрогенных рецепторов (AR), а также экспрессии p53 и Bcl-2 проводилось одноэтапным методом с демаскировкой антигена (методом высокотемпературной обработки ткани) на парафиновых срезах с использованием диагностических наборов фирмы Novocastra Laboratories Ltd (Великобритания) для AR и p53, фирмы Dako (Дания) для Bcl-2. Результаты идентификации AR оценивались полуколичественным методом Histochemical score [6]. Значения p53 и Bcl-2 представлены в виде процентного отношения числа положительных клеток к 1000 просмотренным клеткам.

Статистический анализ. Статистический анализ проводился методами дисперсионного анализа повторных измерений и дисперсионного анализа сравнения двух групп с использованием критерия Стьюдента. Все данные в тексте и таблицах представлены в форме средних значений и стандартных отклонений ($M \pm \sigma$). Также указаны значения критерия Стьюдента (t) [7].

Результаты и их обсуждение

В первой части исследования через 1 месяц после проведения химиотерапии или таргетной терапии у всех 11 онкологических больных развивалась лейкопения, сопровождавшаяся увеличением содержания основного фактора роста фибробластов (FGFb) в крови в среднем в 1,74 раза. При этом исходный средний уровень основного фактора роста фибробластов (FGFb) до лечения у всех 11 онкологических больных был в 5,5 раз выше аналогичного значения у молодых людей контрольной группы (таблицы 1, 2). Также у онкологических больных основной группы после проведения химиотерапии / таргетной терапии наблюдалась тенденция к увеличению уровней человеческого васкулоэндотелиального фактора роста А (human VEGF-A) и эпидермального фактора роста человека (human EGF). Так из них у 4-х пациентов наблюдалось увеличение уровня человеческого васкулоэндотелиального фактора роста А (human VEGF-A) в среднем в 1,25 раза (с $351,1 \pm 189,7$ пг/мл до $439,4 \pm 161,7$ пг/мл) и у 3-х пациентов увеличение уровня эпидермального фактора роста человека (human EGF) в среднем в 1,13 раза (с $217,8 \pm 22,9$ пг/мл до $246,4 \pm 2,5$ пг/мл) (таблицы 3, 4).

Во второй части исследования у 4-х пациентов через 3 - 6 месяцев после завершения курса из 4 - 7 трансфузий моноклеарной фракции периферической крови содержание гемопоэтических клеток-предшественников (ГКП) CD34⁺ периферической крови увеличилось в среднем в 3,3 раза (с 1 до 2 - 5 клеток в 1 мкл, в среднем до 3,3 клеток в 1 мкл). Сравнение полученного результата с данными инструкции Stem-Kit Reagents, Beckman Coulter Company (Франция) о 117 здоровых лицах разных возрастных групп с максимальным значением CD34⁺ периферической крови у молодых людей - 6,5 кл/мкл и минимальным значением у лиц более старшего возраста - 0,5 кл/мкл показало, что у пациентов после завершения курса переливаний моноклеарной фракции периферической крови от доноров 19 - 23 лет содержание гемопоэтических клеток-предшественников (ГКП) CD34⁺ периферической крови увеличилось до значения, характерного для молодых лиц. Это свидетельствует о том, что у 60 - 82 летних пациентов удалось восстановить пул стволовых клеток до уровня молодых лиц (таблица 5, 8). После восстановления у 4-х пациентов 60 - 82 лет пула стволовых клеток, а значит и процесса регенерации до уровня молодых лиц, через 3 - 6 месяцев после

завершения курса трансфузий моноклеарной фракции периферической крови наблюдалось уменьшение уровня основного фактора роста фибробластов (FGFb) в среднем в 1,78 раза (таблица 5). Среднее содержание основного фактора роста фибробластов (FGFb) в сыворотке крови у пациентов, получавших трансфузии моноклеарной фракции периферической крови, до начала трансфузий превышало среднее значение данного показателя у группы молодых практически здоровых доноров крови в 2,7 раза (таблица 6). После завершения курса трансфузий моноклеарной фракции периферической крови сравнение средних значений основного фактора роста фибробластов (FGFb) у пациентов основной и контрольной групп было статистически не значимо (таблица 7). Также у пациентов, получавших трансфузии моноклеарной фракции периферической крови, после завершения курса из 4 – 7 трансфузий наблюдалась тенденция к уменьшению уровней человеческого васкулоэндотелиального фактора роста А (human VEGF-A) и эпидермального фактора роста человека (human EGF). Из них у 2-х пациентов уровень человеческого васкулоэндотелиального фактора роста А (human VEGF-A) уменьшился в среднем в 1,48 раза (с $209,1 \pm 4,5$ нг/мл до $140,8 \pm 48,6$ нг/мл), у 3-х пациентов из них уровень эпидермального фактора роста человека (human EGF) уменьшился в среднем в 4,12 раза (с $146,6 \pm 84,3$ нг/мл до $35,5 \pm 15,1$ нг/мл) (таблица 9). Снижение уровней клеточных ростовых факторов закономерно привело у всех 4-х пациентов в буккальном эпителии к снижению экспрессии p53 в среднем в 6,02 раза, у 3-х из них - к снижению экспрессии Vcl-2 в среднем в 60,0 раз. Восстановление количества клеток Лейдига и собственной продукции тестостерона у пациентов старше 40 лет, наблюдающееся при переливании моноклеарной фракции периферической крови от молодых доноров 18-23 лет [8], привело у пациентов основной группы мужского пола (у 3 пациентов) к уменьшению экспрессии андрогенных рецепторов (AR) в среднем в 2,12 раза (таблица 5). У всех 4-х пациентов 60 – 82 лет после завершения переливаний моноклеарной фракции периферической крови от доноров 19 – 23 лет при гистологическом исследовании слизистой буккального эпителия наблюдалось утолщение эпителиального пласта за счёт более выраженного развития базального и парабазального слоёв, увеличение числа мелких сосудов, исчезновение явлений паракератоза, исчезновение или уменьшение

дистрофически-изменённых эпителиальных клеток (клеток с оптически пустой цитоплазмой), увеличение лимфоцитарной инфильтрации.

У позвоночных популяции дифференцированных клеток подвержены обновлению, непрерывно происходит гибель старых клеток и их замещение новыми. Обновление может происходить простым делением с образованием двух дочерних клеток того же типа или за счёт клеток-предшественников камбиальных зон. Камбиальные клетки при делении образуют потомство, часть которого продолжает дифференцировку, а часть остаётся низкодифференцированным [9]. Коммитированные клетки-предшественники и дифференцированные клетки, вступив на путь дифференцировки или завершив его, могут делиться ограниченное число раз [9] и не в состоянии обеспечить регенерацию ткани на протяжении всего онтогенеза [4]. Обновление тканей на протяжении такого длительного периода невозможно без участия специализированной системы, ответственной за регенерацию. Составной частью этой системы являются плюрипотентные стволовые клетки, которые способны мигрировать и дифференцироваться во все типы соматических клеток и в линию половых клеток, а также обладают способностью к самообновлению на протяжении всей жизни организма [4]. Базальная мембрана, подстилающая эпителиальный слой, не препятствует миграции через неё стволовых клеток для пополнения ими состава низкодифференцированных клеток камбиальных зон, обеспечивающих замену старых клеток [9]. Плюрипотентные стволовые клетки являются отдельной ветвью дифференцировки эмбриональных клеток [9], обеспечивающей регенерацию всех тканей организма на протяжении онтогенеза [4].

У старых клеток происходит десИАлирование клеточной поверхности и нарушение защиты концевых мембранных гликопротеинов, содержащих маннозу. Появление свободной маннозы на поверхности клеток делает их доступными для распознавания макрофагами. Включается первая линия иммунной защиты – реакции естественного иммунитета, основанные на филогенетически более древнем защитном процессе – воспалении. При некрозе (апоптозе) старых клеток и развивающемся при этом воспалении макрофаги, а также окружающие эпителиальные и эндотелиальные клетки, клетки стромы кровеносных и лимфоидных органов образуют колониестимулирующие и клеточные ростовые

факторы, интерлейкины [10, 11]. Колониестимулирующие факторы вызывают пролиферацию плюрипотентных стволовых клеток [9] для их последующего поступления в камбиальные зоны или непосредственно в места гибели старых клеток [4]. Клеточные ростовые факторы, действуя в различных комбинациях, избирательно стимулируют пролиферацию и дифференцировку клеток-предшественниц камбиальных зон [9]. Управление процессами дифференцировки осуществляет соответствующая часть программы развития, иницирующая в строгой последовательности местное образование клеточным окружением клеточных ростовых факторов, а также появление комплиментарных им рецепторов у клеток-предшественников. Инкреция клеточных ростовых факторов продолжается до полного восстановления повреждённой ткани или образования активированными ими фибробластами фиброзной ткани на месте повреждения. При достаточной численности пула плюрипотентных стволовых клеток у людей молодого возраста пополнение ими клеточного состава камбиальных зон и последующее обновление тканей адекватно гибели старых клеток. После замещения погибших старых клеток новыми клетками локальная продукция клеточных ростовых и колониестимулирующих факторов прекращается. Кратковременное физиологическое образование клеточных ростовых факторов к развитию злокачественного перерождения тканей не приводит [4].

Направление миграции стволовых клеток осуществляется через образование у них в несколько этапов тканеспецифичных рецепторов. Первоначально в ответ на десИАлирование и появление на поверхности старых или интенсивно пролиферирующих клеток глюкопротеинов со свободной концевой маннозой происходит связывание антиген-представляющих клеток (макрофагов и других) с тканеспецифичными антигенами. Антиген-представляющие клетки доставляют тканеспецифичные антигены погибших старых клеток в лимфатические узлы или иные лимфоидные органы Т-хелперам [4, 11]. После анализа поступивших антигенов Т-хелперы используют антиген-представляющие клетки в качестве посредников (повышающих вероятность встречи между постоянно циркулирующими клетками) для активирования плюрипотентных стволовых клеток / Т-киллеров с образованием на их поверхности тканеспецифичных рецепторов, определяющих места их миграции [4]. Презентация антигенов

пораженных вирусами клеток или антигенов чужеродных тканей приводит к активации Т-киллеров [11], а презентация аутоантигенов погибших старых клеток - к активации плюрипотентных стволовых клеток с последующим их направлением на восстановление соответствующих тканей [4]. Т-хелперы прикрепляются к эндотелиальным клеткам посткапиллярных венул, протискиваются между ними, а затем мигрируют в лимфатические сосуды, по которым поступают в лимфатические узлы. Данный путь повторяют Т-киллеры [9] и плюрипотентные стволовые клетки [4]. Активирование Т-хелперами (Th1) Т-киллеров сопровождается паракринным и аутокринным образованием IL-2, инициирующим экспрессию Vcl-2 и предохраняющим активированные Т-киллеры от апоптоза [11]. Аналогичным образом после контакта с Т-хелперами через экспрессию Vcl-2 предотвращается развитие апоптоза у высокочувствительных к неблагоприятным условиям среды стволовых клеток, мигрирующих в область повреждения или гибели старых клеток и оказывающихся под воздействием образующихся при воспалении высокоактивных продуктов (активных форм азота и кислорода, TNF α , INF γ и других) [4]. Дополнительно экспрессия Vcl-2 у коммитированных стволовых клеток вызывается IL-7, продуцируемым эндотелиальными клетками, между которыми мигрируют стволовые клетки. Участие Т-хелперов в процессе обновления тканей [4] определяет значительное преобладание аутоантигенов (99%) среди пептидов, представляемых Т-хелперам и анализируемых ими, а также существенное преобладание субпопуляции CD4⁺-лимфоцитов (Т-хелперов) над CD8⁺-лимфоцитами (Т-киллерами) в крови и в лимфе [11]. Соответственно управление процессами регенерации является ведущей функцией иммунной системы [4]. Возрастная инволюция тимуса сопровождается снижением его массы, а также замещением эпителиального компартмента соединительной тканью и производными фибробластов - адипоцитами. После 50-60 лет отмечается снижение количества Т-хелперов в крови, негативно влияющее на формирование тканеспецифичных рецепторов у стволовых клеток и на процесс регенерации. Несмотря на это на протяжении всей жизни человека в тимус продолжают поступать стволовые клетки, и из тимуса продолжают мигрировать зрелые Т-клетки [11].

Гибель старых клеток (некроз, апоптоз) и последующая регенерация происходят на протяжении всего онтогенеза, как проявление нормальной жизнедеятельности организма [10, 11]. В организме каждую секунду происходит некроз / апоптоз миллионов старых клеток, приводящий к множеству локальных участков воспаления. Для поддержания нормального состояния организма должно образовываться такое же количество новых клеток [9]. Представление о бессмертии плюрипотентных стволовых клеток – их способности к неограниченному числу делений является условным [9]. После 35-40 лет численность пула плюрипотентных стволовых клеток и пополняемых ими камбиальных зон прогрессивно снижается [1], делая невозможным замещение погибших старых клеток адекватным количеством низкодифференцированных клеток-предшественников (или мигрировавших напрямую стволовых клеток) [4]. Образование клеточных ростовых факторов происходит обратно пропорционально плотности клеточной популяции [9]. По этой причине в ответ на гибель старых клеток и недостаточное их восполнение молодыми клетками повышается продукция эпителиальными и эндотелиальными клетками, макрофагами клеточных ростовых факторов (для стимуляции пролиферации низкодифференцированных клеток камбиальных зон) и колониестимулирующих факторов (для стимуляции пролиферации плюрипотентных стволовых клеток) [4]. Несмотря на развитие данных компенсаторных реакций у людей после 35-40 лет пул плюрипотентных стволовых клеток и клеточный состав камбиальных зон продолжают сокращаться, всё меньше справляясь с заменой погибших старых клеток. Закономерно с увеличением возраста продукция клеточных ростовых факторов, направленных на стимуляцию пролиферации и увеличение численности клеток камбиальных зон, нарастает. Содержание клеточных ростовых факторов в крови и в тканях становится постоянно высоким. Избыточная, нарастающая пропорционально возрасту, митогенная стимуляция, наблюдаемая во всех тканях у людей старше 35-40 лет, неотвратно приводит к метаплазии, а затем к малигнизации [4]. Риск злокачественной трансформации дополнительно повышается при наличии предрасполагающих наследственных факторов, а также при местном действии митогенных факторов (как внешних, так и внутренних, образующихся, например, при хроническом воспалении) [4].

К малигнизации может привести длительно протекающий хронический воспалительный процесс. Продолжительное действие факторов альтерации, вызванная ими гибель большого числа клеток, ответное образование клеточных ростовых факторов, направленных на стимуляцию пролиферации камбиальных клеток, а также блокирование развития апоптоза через экспрессию Bcl-2 становятся основными патогенетическими факторами злокачественной трансформации при хроническом воспалительном процессе [4]. Злокачественное перерождение хронических язв желудка, слизистой полости рта (при хроническом прикусе) и другие примеры [3] подтверждают данное заключение [4].

Риск злокачественного перерождения клеток, имеющих рецепторы половых гормонов, дополнительно повышается при возрастном снижении продукции половых гормонов, необходимых для деления и дифференцировки данных клеток. В ответ на снижение продукции тестостерона у мужчин после 35-40 лет развиваются компенсаторно-приспособительные реакции, направленные на повышение митогенной стимуляции, их выраженность пропорциональна степени снижения продукции тестостерона [12, 13, 14, 15]. По этой причине рак предстательной железы является одним из наиболее распространённых онкологических заболеваний у мужчин старше 40 лет. Первичная опухоль чаще является андроген-зависимой [16], поскольку злокачественная трансформация клеток наступает на андроген-зависимом этапе их дифференцировки [14].

Повышение митогенной стимуляции сопровождается развитием постоянно-повышенной экспрессии генов, ответственных за образование клеточных ростовых факторов и их рецепторов. Происходит трансформация протоонкогенов, ответственных в нормальных условиях за деление клеток в ответ на действие ростовых факторов, в онкогены. Например, онкоген *erbB* начинает кодировать урезанный вариант рецептора эпидермального ростового фактора (EGF), который теряет EGF-связывающий наружный домен, но сохраняет внутриклеточный домен с тирозин-специфической протеинкиназной активностью. Клетки с такими дефектными рецепторами ведут себя так, как будто на них постоянно действует сигнал эпидермального ростового фактора к пролиферации [9].

Основной фактор роста фибробластов (FGFb), эпидермальный ростовой фактор (EGF), инсулиноподобные факторы роста I и II (IGF-I, IGF-II), а также ряд

других клеточных ростовых факторов обладают выраженной митогенной активностью и являются промоторными факторами канцерогенеза [17]. Наибольшей митогенной активностью обладает основной фактор роста фибробластов (FGFb). Постоянно-повышенные уровни клеточных ростовых факторов, блокирование развития апоптоза (обусловленное экспрессией белка Vcl-2) у активированных Т-хелперами стволовых клеток и пополняемых ими клеток камбиальных зон, трансформация протоонкогенов в онкогены могут приводить к метаплазии, а в последующем и к малигнизации [4]. Метаплазия носит непрямой характер и начинается с пролиферации изменённых под действием вышеуказанных митогенных факторов камбиальных клеток, дифференцирующихся в новый тип клеток (например, в ороговевающий плоский эпителий, вместо призматического) [10]. Длительно протекающая стимуляция митогенной активности вызывает злокачественное перерождение эпителия, а также паренхиматозных, стромальных и других клеток. Аналогично клональной селекции лимфоцитов каждая изменённая недифференцированная камбиальная клетка образует семейство, дающее начало метаплазированным клеткам [4]. Поскольку вышеописанные изменения развиваются в подавляющем числе тканей у всех людей, то после 40 лет риск развития канцерогенеза повышается. Появление злокачественной опухоли становится предопределённым процессом. Конкретная локализация опухоли и время её появления определяются отдельными иницирующими и наследственными факторами [4]. Закономерно А.И. Струков и В.В. Серов [10] описывали возможность возникновения опухоли в любой ткани и в любом органе.

О выраженности компенсаторного образования клеточных ростовых факторов в ответ на незавершённость регенерации тканей свидетельствует превышение в 5,5 раза среднего уровня основного фактора роста фибробластов (FGFb) в крови у 54 - 76 летних больных раком предстательной железы, мочевого пузыря и почки в III - IV стадии заболевания основной группы (до начала проведения химиотерапии / таргетной терапии) по сравнению с аналогичным показателем у молодых практически здоровых доноров крови контрольной группы. Данные изменения стали одной из основных причин развития злокачественного процесса у наблюдавшихся онкологических больных (таблица 1).

Среднее содержание основного фактора роста фибробластов (FGFb) в крови у онкологических больных до начала проведения химиотерапии / таргетной терапии и у группы молодых практически здоровых доноров крови

Группы исследования \ Показатели	FGFb, пг/мл
Основная группа больных раком предстательной железы, мочевого пузыря и почки в III - IV стадии заболевания до начала проведения химиотерапии / таргетной терапии (n=11)	5,0 ± 2,6
Контрольная группа молодых практически здоровых доноров крови (n=11)	0,9 ± 0,8
t	4,917
p	p < 0,001

Примечание: FGFb - основной фактор роста фибробластов.

Для обеспечения прогрессирования роста опухоли недостаточно стимуляции деления злокачественных клеток. Требуется постоянное пополнение камбиальной зоны с изменёнными камбиальными клетками (метаплазированными или раковыми) стволовыми клетками, трансформирующимися в них под влиянием клеточного окружения. Данные ряда авторов [9, 10] о начале интенсивного роста опухоли после наступления её васкуляризации, сопровождающейся значительным увеличением поступления в данную область стволовых клеток, а также выявление среди клеток злокачественных опухолей стволовых клеток и клеток-предшественников подтверждают данное заключение [4]. Злокачественная трансформация камбиальных клеток, повышающая число их делений, направлена на компенсацию хронической недостаточности камбиальных клеток, а также пополняющих их стволовых клеток у лиц старше 35-40 лет [4]. Подтверждает данное заключение появление сходства злокачественных клеток со стволовыми клетками, например, появление у них эмбриональных антигенов [10].

Рассмотренные факторы, образующиеся при гибели старых клеток и развивающемся при этом воспалении, приводят к инициации злокачественной трансформации клеток и определяют механизмы прогрессирования роста опухоли [4]. По периферии опухоли располагается зона перифокального (демаркационного) воспаления. В числе прочих клеток в этой зоне находятся макрофаги [10, 18], которых привлекает свободная манноза десилированной поверхности интенсивно

пролиферирующих клеток и другие антигены, образующиеся при некрозе / апоптозе клеток [4]. Подобно остеокластам (образующихся из моноцитов и являющихся разновидностью макрофагов), разрушающих костный матрикс при обновлении костной ткани [9], макрофаги зоны перифокального воспаления, выделяя гидролитические ферменты, лизируют окружающие ткани (разрушают эндотелий, базальные мембраны, фибронектин, коллаген, эластин, костный матрикс и другие структуры), освобождая место для опухолевых клеток. Интенсивное образование клеточных ростовых факторов, стимулирующих пролиферацию клеток эндотелия (сосудистый ростовой фактор и другие, выделяемые макрофагами), обуславливает пролиферацию эндотелиоцитов и формирование новых сосудов (ангиогенез). В свою очередь эндотелий в условиях воспаления продуцирует основной фактор роста фибробластов и тромбоцитарный фактор роста, усиливающие пролиферацию, а также образует IL-7, вызывающий экспрессию Vcl-2. Экспрессия Vcl-2, повышая устойчивость клеток к гибели по механизму апоптоза [11], экранирует эндотелий, мигрирующие стволовые клетки и образовавшиеся злокачественные клетки от высокоактивных продуктов цитотоксических клеток и макрофагов [4].

Подтверждением того, что основной причиной повышения митогенной стимуляции - повышения образования клеточных ростовых факторов у людей старше 35-40 лет является незавершённость обновления тканей (незавершённость регенерации), обусловленная сокращением пула стволовых клеток, стало увеличение образования основного фактора роста фибробластов (FGFb) через 1 месяц после начала проведения химиотерапии или таргетной терапии у всех наблюдавшихся онкологических пациентов. На фоне развившейся лейкопении, свидетельствующей о подавлении пула стволовых клеток препаратами химиотерапии / таргетной терапии и усугублении нарушения обновления тканей (нарушения регенерации), у всех 11 пациентов основной группы первого этапа исследования, имевших исходно повышенные уровни основного фактора роста фибробластов (FGFb) в крови, наступило дополнительное увеличение образования данного фактора в крови в среднем в 1,74 раза (таблица 2). Также у онкологических больных основной группы после проведения химиотерапии / таргетной терапии наблюдалась тенденция к увеличению в крови уровней

человеческого васкулоэндотелиального фактора роста А (human VEGF-A) и эпидермального фактора роста человека (human EGF). У 4-х из них увеличение уровня человеческого васкулоэндотелиального фактора роста А (human VEGF-A) произошло в среднем в 1,25 раза, а у 3-х из них - увеличение уровня эпидермального фактора роста человека (human EGF) в среднем в 1,13 раза (таблицы 3-4).

Таким образом, оказываемое при проведении химиотерапии или таргетной терапии цитостатическое воздействие не только на опухоль, но и на плюрипотентные стволовые клетки костного мозга, приводит к дополнительной стимуляции митогенной активности, повышению риска развития рецидива опухоли и риска её метастазирования, а также к появлению новых опухолей иных локализаций. Патологические процессы, аналогичные вышеописанным, характерны для пациентов с ревматологическими заболеваниями, которым назначается иммуносупрессивная терапия, а также для всех людей старше 35-40 лет, у которых происходит уменьшение пула плюрипотентных стволовых клеток и обусловленное этим нарушение обновления тканей. У тех и у других повышается риск развития злокачественных заболеваний.

Таблица 2

Среднее содержание основного фактора роста фибробластов (FGFb) в крови у онкологических больных до начала и через месяц после начала проведения химиотерапии / таргетной терапии

Группы исследования \ Показатели	FGFb, пг/мл
Основная группа больных раком предстательной железы, мочевого пузыря и почки в III - IV стадии заболевания до начала проведения химиотерапии (n=11)	5,0 ± 2,6
Основная группа больных раком предстательной железы, мочевого пузыря и почки в III - IV стадии заболевания через 1 месяц после начала проведения химиотерапии / таргетной терапии (n=11)	8,7 ± 4,7
t	3,607
p	p < 0,005

Примечание: FGFb – основной фактор роста фибробластов.

На поверхности активированного эндотелия, тромбоцитов и лейкоцитов наблюдается экспрессия и адгезия факторов свёртывания, приводящих к образованию фибрина [9, 18]. Адаптивные изменения эндотелия в области воспаления сопровождаются внутри- и внесосудистым свёртыванием фибриногена и образованием тромбов. Вследствие тромбоза сосудов вокруг воспалённого участка ткани развивается некроз. Соответственно, опухоли часто подвержены некрозу и изъязвлению [10]. Ввиду незавершённости процесса регенерации при гибели старых клеток и наличия сопутствующих локальных участков воспаления в подавляющем числе тканей у лиц старше 35-40 лет с увеличением возраста риск тромбообразования также повышается [4].

Во время митоза клетки округляются и утрачивают прочную связь друг с другом (за счёт уменьшения клеточной адгезивности и потери межклеточных контактов). Целостность ткани, состоящей из таких клеток, нарушается [9]. По данной причине метастазирование быстрее наступает у опухолей с наибольшей интенсивностью деления злокачественных клеток [4]. Злокачественные клетки, образование которых направлено на восполнение дефицита плюрипотентных стволовых клеток, приобретают сходство с ними (например, у них появляются эмбриональные антигены). При метастазировании злокачественные клетки повторяют путь и механизмы миграции стволовых клеток в процессе обновления тканей. По аналогии с плюрипотентными стволовыми клетками для контакта злокачественных клеток с Т-хелперами и образования у них тканеспецифичных рецепторов необходима их постоянная циркуляция через вторичные лимфоидные органы. Опухолевые клетки прикрепляются к эндотелиальным клеткам посткапиллярных венул, протискиваются между ними и попадают через лимфатические сосуды в лимфатические узлы и далее через соответствующие группы лимфатических узлов и сосудов в грудной проток, по которому возвращаются в кровь. Данная циркуляция происходит постоянно, приводя к диссеминации опухоли [4]. Направленность метастазирования злокачественных клеток определяется формированием соответствующих тканеспецифичных рецепторов на их поверхности. Этому предшествует связывание во вторичных лимфоидных органах антиген-представляющих клеток (несущих комплексы тканеспецифичных антигенов погибших старых клеток на своей поверхности) с Т-

хелперами, активация Т-хелперов и последующее (при посредничестве антиген-представляющих клеток) взаимодействие Т-хелперов с опухолевыми клетками с образованием тканеспецифичных рецепторов на их поверхности (комплементарных тканеспецифичным антигенам погибших старых клеток) [4]. Появление тканеспецифичных «хоминг-рецепторов» определяет направление миграции злокачественных клеток к местам гибели старых клеток. Преобладание гибели старых клеток над процессами регенерации в большинстве тканей у лиц старше 35-40 лет, сопровождающееся появлением избытка тканеспецифичных хемоаттрактантов (в качестве которых выступают тканеспецифичные антигены погибших старых клеток), способствует наравне со снижением адгезивности и потерей контактов между интенсивно пролиферирующими клетками метастазированию злокачественных опухолей [4]. После контакта с Т-хелперами и образования тканеспецифичных рецепторов злокачественные клетки, поступая в места гибели старых клеток под воздействием клеточного окружения, определяющего направленность дифференцировки, меняют свою гистологическую структуру, приобретая свойства клеток-предшественников камбиальной зоны данных тканей. Это может создавать иллюзию развития первично-множественной опухоли. В случае, если метастазы образуются только благодаря адгезивным клеточным взаимодействиям, то пролиферация опухолевых клеток будет происходить с минимальным влиянием клеточного окружения, без их включения в механизмы местной дифференцировки. Гистологическая структура такой опухоли будет в значительной степени соответствовать первичной опухоли.

Блокирование остеокластов (макрофагов), как антиген-представляющих клеток, при применении бифосфонатов нарушает процесс представления антигенов погибших старых клеток костной ткани Т-хелперам для образования соответствующих тканеспецифичных рецепторов у стволовых и опухолевых клеток. Соответственно эффект бифосфонатов достигается за счёт блокирования механизма миграции стволовых и опухолевых клеток при обновлении погибших старых клеток костной ткани. Нарушение естественного механизма обновления костной ткани с лизисом остеокластами погибших старых клеток при применении бифосфонатов сопровождается образованием секвестров, состоящих из нефагоцитированных конгломератов погибших старых остеоцитов [4].

Описанные выше закономерности демонстрирует клинический пример повышения уровней основного фактора роста фибробластов (FGFb), человеческого васкулоэндотелиального фактора роста А (human VEGF-A) и эпидермального фактора роста человека (human EGF) в сыворотке крови у пациента 57 лет до и через 1 месяц после начала проведения ему таргетной терапии по поводу рака почки T₂N₁M₁ (таблица 3). Аналогичные изменения наблюдались у пациента 54 лет до и через 1 месяц после начала проведения паллиативной химиотерапии по поводу рака мочевого пузыря T₂N₁M₁ (таблица 4). Представленные примеры демонстрируют увеличение продукции клеточных ростовых факторов и увеличение ими митогенной стимуляции в ответ на подавление пула стволовых клеток и обусловленное этим нарушение обновления тканей (нарушения регенерации). Полученные результаты показывают, что одновременно с воздействием на опухоль химиотерапия или таргетная терапия, подавляя пул плюрипотентных стволовых клеток и нарушая обновление тканей, приводят к стимуляции митогенной активности, повышая риск развития рецидива опухоли, её метастазирования и развития новых опухолей иных локализаций. По этой причине при местно-локализованном опухолевом процессе для минимизации токсического влияния на костный мозг и содержащиеся в нём плюрипотентные стволовые клетки химиотерапию / таргетную терапию целесообразно проводить регионально с внутриартериальным селективным введением препаратов.

Таблица 3

Клинический пример повышения уровней клеточных ростовых факторов в крови у пациента 57 лет, получавшего таргетную терапию по поводу рака почки T₂N₁M₁

Показатели \ Пациент	Пациент 57 лет, диагноз - рак почки T ₂ N ₁ M ₁ (pulm), получавший таргетную терапию	
	до начала таргетной терапии	через 1 мес после начала таргетной терапии
FGFb, пг/мл	5,4	17,1
human VEGF-A, пг/мл	186,4	232,4
human EGF, пг/мл	188,1	244,6

Примечание: FGFb - основной фактор роста фибробластов, human VEGF-A - человеческий васкулоэндотелиальный фактор роста А, human EGF - эпидермальный фактор роста человека.

Таблица 4

Клинический пример повышения уровней клеточных ростовых факторов в крови у пациента 54 лет, получавшего паллиативную химиотерапию по поводу рака мочевого пузыря T₂N₁M₁

Показатели \ Пациент	Пациент 54 лет, диагноз - рак мочевого пузыря T ₂ N ₁ M ₁ , получавший паллиативную химиотерапию (ПХТ)	
	до начала ПХТ	через 1 мес после начала ПХТ
FGFb, пг/мл	7,9	15,2
human VEGF-A, пг/мл	655,6	686,4
human EGF, пг/мл	243,8	250,0

Примечание: ПХТ - паллиативная химиотерапия, FGFb - основной фактор роста фибробластов, human VEGF-A - человеческий васкулоэндотелиальный фактор роста А, human EGF - эпидермальный фактор роста человека.

Для нормализации процесса обновления тканей – для полного возмещения погибших старых клеток клетками-предшественниками и для обратного развития патологических процессов, связанных с нарушением регенерации, у лиц старше 40 лет требуется восстановление численности пула плюрипотентных стволовых клеток [4]. Положительная клиническая динамика у онкологических больных при назначении им после курса химиотерапии колониестимулирующих факторов косвенно подтверждает данный вывод [19]. К сожалению эффект от стимуляции препаратами колониестимулирующих факторов оказывается временным.

Новые возможности для восстановления пула плюрипотентных стволовых клеток и восстановления регенерации открывает использование эффекта химеризма. Эпителиальные клетки тимуса составляют микроокружение развивающихся тимоцитов. При прямых клеточных контактах они передают Т-хелперам информацию об антигенах собственных тканей и формируют у них тип ответных реакций на презентуемые антигены [11]. Заселение тимуса стволовыми клетками обеспечивает не только последующее образование Т-клеток, но и обновление клеток эпителиального ретикулума и кортико-медуллярной структуры тимуса [11]. Поскольку эпителиальные клетки тимуса осуществляют процесс обучения Т-хелперов различать свои и чужие антигены, то обновление погибших старых эпителиальных клеток тимуса донорскими аллогенными стволовыми клетками приводит к появлению эпителиальных клеток тимуса, образовавшихся из стволовых клеток донора. Такие эпителиальные клетки начинают обучать Т-

хелперы реципиента распознавать клетки донора, как «своё». После трансфузии плюрипотентные стволовые клетки, содержащиеся в моноклеарной фракции периферической крови, образуют колонии в костном мозге и принимают участие в обновлении всех тканей организма, включая эпителиальные клетки тимуса. Индивидуум становится химерой. Химеризм широко распространён в живой природе. Например, химеризм развивается у всех особей женского пола после родов. При родах у женщин в кровоток попадает небольшое количество крови ребёнка, включая содержащиеся в ней плюрипотентные стволовые клетки. Последние образуют колонии в костном мозге матери [4]. При рождении детей с группами крови отличными от группы крови матери формирование эритроидного ростка матери частично происходит из полученных ею стволовых клеток детей. У многорожавших женщин это приводит к трудности определения групп крови.

Искусственное формирование химерной особи через трансфузию моноклеарной фракции периферической крови, заготовленной от молодых доноров 18-23 лет, содержащей плюрипотентные стволовые клетки, может быть использовано для поддержания нормальной численности пула плюрипотентных стволовых клеток, восстановления регенерации и обратного развития последствий её нарушения у людей старше 40 лет [4, 8]. Данное положение подтверждается увеличением в среднем в 3,3 раза (с 1 до 2 - 5 клеток в 1 мкл, в среднем до 3,3 клеток в 1 мкл) содержания гемопоэтических клеток-предшественников (ГКП) CD34⁺ периферической крови у 4-х пациентов основной группы второй части исследования через 3 - 6 месяцев после завершения курса из 4 - 7 трансфузий моноклеарной фракции периферической крови. Сравнение полученного результата с данными инструкции Stem-Kit Reagents, Beckman Coulter Company (Франция) о 117 здоровых лицах разных возрастных групп с максимальным значением CD34⁺ периферической крови у молодых людей в 6,5 кл/мкл и минимальным значением CD34⁺ периферической крови у лиц более старшего возраста - 0,5 кл/мкл показывает, что у пациентов после завершения курса переливаний моноклеарной фракции периферической крови от доноров 19 - 23 лет содержание гемопоэтических клеток-предшественников (ГКП) CD34⁺ периферической крови увеличилось до значения, характерного для молодых лиц. Таким образом, у 4-х наблюдаемых пациентов 60 - 82 лет пул стволовых клеток, а

значит и процесс регенерации удалось восстановить до уровня людей молодого возраста (таблица 5, 8).

У всех 4-х пациентов 60 – 82 лет после завершения курса трансфузий моноклеарной фракции периферической крови, заготовленной от молодых доноров, и восстановления процесса обновления тканей (восстановления регенерации) при гистологическом исследовании слизистой буккального эпителия наблюдалось обратное развитие атрофических изменений с утолщением эпителиального пласта за счёт более выраженного развития базального и парабазального слоёв, с увеличением лимфоцитарной (моноклеарной) инфильтрации (как проявление увеличения числа мигрировавших коммитированных стволовых клеток) и с другими описанными изменениями. При этом выбор буккального эпителия был случайным, обусловленным простотой забора материала. Изменения в буккальном эпителии отражали общие изменения в тканях на фоне восстановления процесса регенерации и уменьшения содержания клеточных ростовых фактов в плазме крови у наблюдаемых пациентов после завершения курса трансфузий.

Восстановление пула плюрипотентных стволовых клеток и восстановление процесса обновления тканей (восстановление регенерации) у 4-х пациентов 60 - 82 лет после завершения курса трансфузий моноклеарной фракции периферической крови привело к значимому уменьшению у всех пациентов содержания основного фактора роста фибробластов (FGFb), средний уровень которого уменьшился в 1,78 раза, приблизившись к уровню аналогичного показателя у 4-х молодых лиц 19-22 лет контрольной группы (таблица 5). При этом среднее содержание основного фактора роста фибробластов (FGFb) в сыворотке крови у 4-х пациентов, получавших трансфузии моноклеарной фракции периферической крови, до начала трансфузий значимо в 2,7 раза превышало среднее значение данного показателя у контрольной группы из 4-х молодых практически здоровых доноров крови (таблица 6). Сравнение средних значений основного фактора роста фибробластов (FGFb) у пациентов основной группы после завершения курса трансфузий и у молодых лиц контрольной группы выявило отсутствие статистических различий между ними (таблица 7).

После восстановления регенерации у 4-х пациентов основной группы второй части исследования, наступившей после завершения курса трансфузий моноклеарной фракции периферической крови, наблюдалась тенденция к уменьшению уровней человеческого васкулоэндотелиального фактора роста А (human VEGF-A) и эпидермального фактора роста человека (human EGF). Из 4-х пациентов основной группы у 2-х пациентов уровень человеческого васкулоэндотелиального фактора роста А (human VEGF-A) уменьшился в среднем в 1,48 раза, у 3-х пациентов из них уровень эпидермального фактора роста человека (human EGF) уменьшился в среднем в 4,12 раза (таблица 9).

Экспрессия белка p53, как регулятора клеточного цикла и супрессора образования злокачественных опухолей, а также экспрессия белка Bcl-2 - внутриклеточного регулятора, предотвращающего развитие апоптоза в целях компенсаторного сохранения численности клеточного состава камбиальных зон в условиях дефицита поступления стволовых клеток, повышаются при увеличении митогенной стимуляции и снижаются при её уменьшении. Восстановление пополнения камбиальных зон мигрирующими донорскими коммитированными стволовыми клетками и ответное снижение образования клеточных ростовых факторов у всех 4-х пациентов после завершения курса трансфузий моноклеарной фракции периферической крови закономерно привело к снижению в буккальном эпителии экспрессии p53 в среднем в 6,02 раза, а у 3-х из них - к снижению экспрессии Bcl-2 в среднем в 60,0 раз (таблицы 5, 9).

Восстановление количества клеток Лейдига и продукции ими тестостерона у пациентов старше 40 лет, наблюдающееся при переливании моноклеарной фракции периферической крови от молодых доноров 18-23 лет [8], привело у пациентов мужского пола основной группы (у 3-х пациентов) к уменьшению экспрессии андрогенных рецепторов (AR) в среднем в 2,12 раза (таблицы 5, 9). При недостатке тестостерона число андрогенных рецепторов (AR), не сумевших захватить молекулы гормона, увеличивается. Напротив, при восстановлении продукции тестостерона все вновь образующиеся андрогенные рецепторы (AR) на поверхности ядра сразу захватывают присутствующие в достаточном количестве молекулы тестостерона и погружаются внутрь ядра клетки, при этом экспрессия андрогенных рецепторов (AR) существенно уменьшается [14]. Данная

закономерность наблюдалась у пациентов основной группы после завершения у них трансфузий моноклеарной фракции периферической крови.

Таблица 5

Показатели пациентов, получавших трансфузии моноклеарной фракции периферической крови, до и после трансфузий

Группы исследования \ Показатели	ГКП CD34 ⁺ , кл/мкл (n=4)	FGFb, пг/мл (n=4)	p53, % (n=4)	Bcl-2, % (n=3)	AR, Histochemical score (n=3)
Основная группа до начала трансфузий моноклеарной фракции периферической крови	1 ± 0	1,9 ± 0,8	52,7 ± 25,5	60,0 ± 29,4	60 ± 29,4
Основная группа через 3-6 мес после завершения курса трансфузий моноклеарной фракции периферической крови	3,3 ± 1,1	1,1 ± 0,7	8,7 ± 8,9	0	28,3 ± 29,5
t	3,576	2,458	4,130	2,882	7,181
p	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,001

Примечание: ГКП CD34⁺ - гемопоэтические клетки-предшественники CD34⁺, FGFb - основной фактор роста фибробластов, AR – андрогенные рецепторы.

Таблица 6

Среднее содержание основного фактора роста фибробластов (FGFb) в крови у пациентов, получавших трансфузии моноклеарной фракции, до начала трансфузий и у группы молодых практически здоровых доноров крови

Группы исследования \ Показатели	FGFb, пг/мл
Основная группа больных до начала трансфузий моноклеарной фракции периферической крови (n=4)	1,9 ± 0,8
Контрольная группа молодых практически здоровых доноров крови (n=4)	0,7 ± 0,6
t	2,448
p	p < 0,05

Примечание: FGFb - основной фактор роста фибробластов.

Таблица 7

Среднее содержание основного фактора роста фибробластов (FGFb) в крови у пациентов, получавших трансфузии моноклеарной фракции, после их завершения и у группы молодых практически здоровых доноров крови

Группы исследования \ Показатели	FGFb, пг/мл
Основная группа больных после завершения трансфузий моноклеарной фракции периферической крови (n=4)	1,1 ± 0,7
Контрольная группа молодых практически здоровых доноров крови (n=4)	0,7 ± 0,6
t	0,734
p	p > 0,05

Примечание: FGFb - основной фактор роста фибробластов.

Таблица 8

Контрольные значения гемопоэтических клеток-предшественников (ГКП) CD34⁺ в периферической крови здоровых людей различных возрастных групп

Ручной метод, n=117	CD34 ⁺ периферической крови здоровых людей (кл/мкл)			
	Минимальное содержание	Максимальное содержание	Среднее содержание	Стандартное отклонение
	0,50	6,50	2,36	1,14

Примечание: приведены данные из инструкции Stem-Kit Reagents, Beckman Coulter Company, Франция, раздел 13.1. Диапазон нормальных значений определялся в образцах крови у здоровых испытуемых различных возрастных групп (n=117; 58 мужчин и 59 женщин).

Эффективность восстановления регенерации у лиц старше 40 лет при переливании им аллогенных плюрипотентных стволовых клеток зависит от разницы между возрастом реципиента и возрастом молодого донора. Принципиальное значение имеет этап долгосрочной внутриклеточной программы, на котором находятся клетки донора и клетки реципиента. Наличие долгосрочных внутриклеточных программ плюрипотентных стволовых клеток, определяющих их пролиферативный потенциал (их способность поддерживать необходимую численность собственного пула), существенно отличает плюрипотентные стволовые клетки молодых лиц от аналогичных клеток людей старше 35-40 лет. Способность стволовых клеток к поддержанию численности собственного пула уменьшается пропорционально возрасту. Численность их пула после 35 лет сокращается на 1% в год, приводя к системным изменениям [4]. По этой причине у

людей старше 35-40 лет фиброз в большинстве тканей и органов развивается с интенсивностью равной скорости сокращения численности пула плюрипотентных стволовых клеток – 1% в год [2, 4]. При существенной разнице в возрасте между молодыми донорами и реципиентами старше 40 лет пролиферативный потенциал плюрипотентных стволовых клеток доноров (их способность поддерживать численность собственного пула) превышает аналогичный показатель реципиентов. В ответ на образование колониестимулирующих факторов это приводит к доминированию перелитых и образовавших колонии в костном мозге донорских плюрипотентных стволовых клеток над аналогичными клетками реципиентов при обновлении всех их тканей. Последнее происходит преимущественно за счёт стволовых клеток доноров [4, 8].

Переливание плюрипотентных стволовых клеток не приводит к их отторжению иммунной системой реципиента, поскольку у стволовых клеток подавлена экспрессия всех тканеспецифичных антигенов, за исключением HLA-G [9, 20]. Последующее развитие иммунологической толерантности обусловлено формированием химеризма, предотвращающего отторжение образовавшихся из донорских стволовых клеток дифференцированных клеток реципиента. Обновление тканей реципиента клетками донора противоположного пола сопровождается нарушением образования половых гормонов и бесплодием. Из донорских плюрипотентных стволовых клеток, образовавших колонии в костном мозге реципиента, при их дифференцировке среди прочего формируется эритроидный росток кроветворения. Трансфузия стволовых клеток периферической крови от донора с отличными от реципиента группами крови приведёт к образованию эритроцитов с донорскими антигенами и к развитию реакций несовместимости [4, 8].

Из вышеизложенного следует, что трансфузия плюрипотентных стволовых клеток в составе моноклеарной фракции периферической крови с целью восстановления пула плюрипотентных стволовых клеток у людей старше 40 лет должна осуществляться от молодых доноров 18-23 лет одного пола и групп крови с реципиентом (патент РФ № 2350340). В целях уменьшения антигенной нагрузки целесообразно все трансфузии каждому из реципиентов проводились от одного донора. Поскольку в естественных условиях у многорожавших женщин

присутствие небольшого количества антигенов других групп крови их детей не приводит к каким-либо осложнениям, то при подборе доноров можно ограничиться учётом групп крови, антигены которых обладают выраженными иммуногенными свойствами. Трансфузии моноклеарной фракции периферической крови требуется проводить многократно до восстановления у реципиентов численности пула плюрипотентных стволовых клеток. Соответственно для получения системного эффекта необходима многократная заготовка моноклеарной фракции периферической крови от одного донора (для каждого реципиента), что ограничивает выбор доноров минимально-разрешённым для них возрастом - 18 лет [4, 8].

Эффективность терапии, направленной на восстановление обновления тканей (восстановление регенерации), демонстрируется клиническим примером пациента 60 лет, у которого после проведения 7 трансфузий моноклеарной фракции периферической крови, заготовленной от одного донора 20 лет, в пять раз увеличилось содержание гемопоэтических клеток-предшественников (ГКП) CD34⁺ периферической крови, что привело к восстановлению регенерации и закономерному снижению в крови содержания основного фактора роста фибробластов (FGFb) в 5,3 раза, человеческого васкулоэндотелиального фактора роста А (human VEGF-A) в 1,1 раза, эпидермального фактора роста человека (human EGF) в 1,1 раза. На фоне снижения уровней клеточных ростовых факторов в буккальном эпителии у пациента снизилась экспрессия p53 в 4,0 раза, Vcl-2 в 70,0 раз. Снижение экспрессии андрогенных рецепторов (AR) в 6,0 раз в буккальном эпителии свидетельствовало о восстановлении количества клеток Лейдига и увеличении продукции ими тестостерона. Полученные данные свидетельствуют о существенном снижении риска развития канцерогенеза у наблюдавшегося пациента. Благодаря формированию химеризма на фоне трансфузий моноклеарной фракции периферической крови, у пациента не было реакций отторжения иммунной системы на перелитые клетки. В частности не наблюдалось повышения СОЭ. Напротив, СОЭ имело тенденцию к снижению, поскольку восстановление процесса обновления тканей у пациента сопровождалось снижением митогенной активности, которое в свою очередь приводило к

снижению у него реакции иммунной системы на пролиферирующие клетки (таблица 9).

Таблица 9

**Клинический пример пациента 60 лет, получившего 7 трансфузий
моноклеарной фракции периферической крови от донора 20 лет**

Показатели пациента 60 лет	До начала трансфузий	После завершения курса из 7-ми трансфузий, спустя 3 месяца после последней из них
Гемопоэтические клетки-предшественники (ГКП) CD34 ⁺ , кл/мкл	1	5
FGFb, пг/мл	2,1	0,4
VEGF-A, пг/мл	213,6	189,5
EGF, пг/мл	38,9	35,5
p53, %	60	15
Bcl-2, %	70	0
AR, Histochemical score	30	5
СОЭ, мм/час	6	3

Примечание: FGFb - основной фактор роста фибробластов, human VEGF-A - человеческий васкулоэндотелиальный фактор роста А, human EGF - эпидермальный фактор роста человека (human EGF), AR – андрогенные рецепторы.

Заключение

Сокращение пула плюрипотентных стволовых клеток и обусловленное этим нарушение обновления тканей у людей старше 35-40 лет являются основными причинами повышения митогенной активности, приводящей к увеличению риска развития канцерогенеза. Трансфузия моноклеарной фракции периферической крови, заготовленной от молодых доноров 18-23 лет одних с реципиентом групп крови и пола (патент РФ № 2350340), позволяет у людей старше 40 лет восстановить пул плюрипотентных стволовых клеток и процесс обновления тканей, снизить митогенную стимуляцию и риск развития онкологических заболеваний, улучшить результаты лечения онкологических заболеваний (направленного на удаление или подавление роста злокачественных клеток), а также может рассматриваться, как перспективный способ уменьшения биологического возраста, существенного продления жизни и трудоспособности (при сохранении высокого качества жизни).

А.В. Печерский

Тел.: +7-921-931-42-98

e-mail: a_pechersky@mail.ru

Литература

1. *Тепляшин А.С.* Характеристика мезенхимальных стволовых клеток человека, выделенных из костного мозга и жировой ткани / А.С. Тепляшин, С.В. Коржикова, С.З. Шарифуллина, Н.И. Чупикова, М.С. Ростовская, И.П. Савченкова // *Цитология.* – 2005. – Т. 47 – № 2. – С. 130–135.
2. *Тареева И.Е.* Нефрология / И.Е. Тареева. – М.: Медицина, 1995. – Т. 1. – 496 с.
3. *Напалков Н.П.* Общая онкология / Н.П. Напалков. – Л.: Медицина, 1989. – 647 с.
4. *Печерский А.В.* Некоторые аспекты процесса регенерации, осуществляемой посредством плюрипотентных стволовых клеток / А.В. Печерский, В.И. Печерский, М.В. Асеев, А.В. Дробленков, В.Ф. Семиглазов // *Цитология.* – 2008. – Т.50 – № 6. – С. 511–520.
5. *Меркулов Г.А.* Курс патологогистологической техники / Г.А. Меркулов. – Л.: МедГиз, 1961. – 346 с.
6. *Jonat W.* Immunohistochemical measurement of estrogen receptors in breast cancer tissue samples / W. Jonat, H. Maass, H.E. Stegner // *Cancer Res.* – 1986. – Vol. 46. – P. 4296–4298.
7. *Glantz S.A.* Primer of biostatistics / S.A. Glantz. – Moscow: Practica, 1999. – 459 p.
8. *Печерский А.В.* Применение клеточных технологий для восстановления процесса регенерации у людей старших возрастных групп / А.В. Печерский, В.И. Печерский, А.Б. Смолянинов, В.Н. Вильянинов, Ш.Ф. Адылов, В.Ф. Семиглазов // *Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова.* – 2014. – Т. 6. – № 4. – С. 52–62.
9. *Alberts B.* Molecular biology of the cell / B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson. – Moscow: Mir, 1994. – Т. 1. – 517 p., Т. 2. – 539 p., Т. 3. – 504 p.

10. *Струков А.И.* Патологическая анатомия / А.И. Струков, В.В. Серов. - М.: Медицина, 1993. – 688 с.
11. *Ярилин А.А.* Основы иммунологии / А.А. Ярилин. – М.: Медицина, 1999. – 608 с.
12. *Pechersky A.V.* Androgen administration in middle-aged and ageing men: effects of oral testosterone undecanoate on dihydrotestosterone, estradiol and prostate volume / A.V. Pechersky, V.F. Semiglazov, V.I. Mazurov, A.I. Karpischenko, V.V. Mikhailichenko, A.V. Udintsev // International Journal of Andrology. – 2002. – Vol. 25. – P. 119–125.
13. *Печерский А.В.* Изменение уровня цитокинов у пациентов с раком предстательной железы после орхиэктомии / А.В. Печерский, В.Ф. Семиглазов, О.Б. Лоран, В.И. Мазуров, В.Ф. Карпищенко, В.Ф. Никифоров, Н.М. Калинина, Л.Б. Дрыгина, Н.И. Давыдова, М.Г. Скоробогатых // TERRA MEDICA nova, специальный выпуск «Лабораторная диагностика». – 2003. – № 2. – С. 26–30.
14. *Печерский А.В.* Изменение экспрессии рецепторов стероидных гормонов при развитии частичного возрастного андрогенного дефицита (PADAM) / А.В. Печерский, В.Ф. Семиглазов, Б.К. Комяков, Б.Г. Гулиев, А.И. Горелов, А.И. Новиков, В.И. Печерский, Н.Н. Симонов, А.В. Гуляев, И.А. Самусенко, М.С. Вонский, А.Г. Миттенберг, О.Б. Лоран // Цитология. – 2005. – Т. 47 – № 4. – С. 311–317.
15. *Печерский А.В.* Влияние частичного возрастного андрогенного дефицита на развитие метаболического синдрома / А.В. Печерский, В.Ф. Семиглазов, В.И. Мазуров, А.И. Карпищенко, В.И. Печерский, Н.Н. Зыбина, Н.И. Давыдова, В.Ю. Кравцов, С.Н. Прошин, М.Г. Скоробогатых, О.Б. Лоран // Лабораторная диагностика. – 2006. – № 4. – С. 12–19.
16. *Моисеенко В.М.* Лекции по фундаментальной и клинической онкологии / В.М. Моисеенко, А.Ф. Урмачеева, К.П. Хансон. – СПб.: Издательство Н-Л., 2004. – 704 с.
17. *Берштейн Л.М.* Гормональный канцерогенез / Л.М. Берштейн. – СПб.: Наука, 2000. – 200 с.
18. *Серов В.В.* Воспаление / В.В. Серов, В.С. Пауков. – М.: Медицина, 1995. – 640 с.

19. *Константинова М.М.* / Принципы и методы оценки эффективности лекарственной терапии и качества жизни больных злокачественными опухолями; под ред. В.М. Моисеенко, А.Ф. Урманчевой, К.П. Хансона. – СПб.: Издательство Н-Л., 2004. – 704 с.

20. *Roitt I.* Immunology / I. Roitt, J. Brostoff, D. Male. – Moscow: Mir, 2000. – 582 p.