

ВОЗМОЖНОСТИ ЭКСПАНСИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК IN VITRO

© Р. И. Дмитриева,¹ С. В. Анисимов^{1, 2}

¹ Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова Минздравсоцразвития РФ,

и ² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

электронный адрес: renata.i.dmitrieva@gmail.com

Гемопоэтические (кроветворные) стволовые клетки (ГСК) с высокой эффективностью обеспечивают непрерывное обновление популяций всего спектра форменных элементов крови. Трансплантация ГСК костного мозга и пуповинной крови используется в клинической практике для восстановления кроветворения при различных гематологических и онкогематологических заболеваниях у взрослых и детей. Однако более широкое применение этого эффективного метода сдерживается, в частности, малым количеством примитивных ГСК в доступных образцах. Это делает необходимым разработку эффективных протоколов экспансии ГСК in vitro. В данном обзоре обсуждается концепция костномозговой ниши гемопоэза как сложной клеточной системы, проводится сравнительный анализ потенциала разных методов экспансии ГСК in vitro. Обзор иллюстрирован собственными данными, подтверждающими принципиальную возможность применения для экспансии ГСК человека in vitro фидерных клеток разных типов.

Ключевые слова: гемопоэтические стволовые клетки, мезенхимные стволовые клетки, сложные клеточные системы.

Принятые сокращения: ГСК — гемопоэтические стволовые клетки, МСК — мезенхимные стволовые клетки.

Потребность в экспансии ГСК in vitro

Гемопоэтические (кроветворные) стволовые клетки (ГСК) с высокой эффективностью обеспечивают непрерывное обновление популяций всего спектра форменных элементов крови. Трансплантация ГСК используется в клинической практике с начала 70-х годов прошлого столетия (Thomas et al., 1975a, 1975b) для восстановления кроветворения при различных гематологических и онкогематологических заболеваниях у взрослых и детей. В течение двух последних десятилетий были достигнуты значительные успехи в разработке методов выделения, культивирования и экспансии ГСК (McNiece, 2007). Сама пункция костного мозга связана с риском развития некоторых осложнений, она бывает затруднена в определенных клинических ситуациях, а мобилизация стволовых клеток костного мозга в периферический кровоток при помощи фармацевтических воздействий (гранулоцитарного колониестимулирующего фактора; нейтогена) является весьма дорогостоящей процедурой и также связана с риском развития некоторых осложнений.

В настоящее время в широкой клинической практике по-прежнему используются для трансплантаций нефракционированный костный мозг или ГСК, выделенные из костного мозга или периферического кровотока. Широкое использование трансплантации ГСК в клинической практике (по все более расширяющемуся спектру клинических показаний) существенно ограничивается относительно небольшим количеством стволовых клеток в препаратах, подготавливаемых для трансплантации. В каче-

стве перспективного источника ГСК в последнее время все чаще рассматривается пуповинная кровь, главным недостатком которой является небольшое количество ГСК, которые можно получить из индивидуального препарата (Kelly et al., 2009).

ГСК, полученные из пуповинной крови, обладают рядом существенных преимуществ над ГСК костного мозга: во-первых, средний возраст донора костного мозга составляет около 40 лет, тогда как ГСК пуповинной крови берут у новорожденного, что особенно важно, когда реципиентом является ребенок; во-вторых, при трансплантации полученных из пуповинной крови ГСК существенно снижается риск развития реакции трансплантант-против-хозяина, поскольку иммунные клетки пуповинной крови еще находятся в примитивном (недоразвитом) состоянии. К преимуществам ГСК пуповинной крови относятся также более высокая пролиферативная активность и низкий риск передачи таких инфекций, как цитомегаловирус и вирус Эпштейна-Барр (EBV, HHV-4). Использование ГСК пуповинной крови не предполагает длительного поиска подходящего донора, и клетки могут использоваться немедленно, что, однако, несет генетические риски (Anisimov et al., 2010).

Наиболее же существенным недостатком препаратов пуповинной крови является малое количество примитивных ГСК в образце. Как следствие этого трансплантация ГСК пуповинной крови оказывается успешной преимущественно у детей (Rubinstein et al., 1998; Gluckman et al., 2001, 2004). При этом по сравнению с результатами трансплантации ГСК костного мозга даже у детей наблю-

дается задержка в приживлении всех клеточных линий, а также задержка в восстановлении функций иммунной системы. Это свидетельствует о том, что низкое содержание примитивных ГСК в трансплантируемом образце влечет серьезные негативные последствия для пациента (Kelly et al., 2009). Именно поэтому экспансия ГСК *in vitro* все чаще рассматривается как необходимый этап подготовки клеток к трансплантации (Hodges et al., 2007).

Существует несколько следующих критериев, которым должны соответствовать ГСК, полученные в результате экспансии *in vitro*: 1) условия культивирования должны обеспечивать преимущественное самообновление (экспансию) ГСК при минимальной дифференцировке, с тем чтобы в конечном продукте увеличивалось содержание именно примитивных стволовых гемопоэтических клеток; 2) композиция клеток в образце, полученном в результате экспансии, должна быть оптимальной с точки зрения максимального сокращения времени наступления терапевтического эффекта после трансплантации; 3) количество полученных ГСК должно быть достаточным при использовании относительно небольшой стартовой популяции клеток, что позволило бы использовать относительно небольшой по объему образец костного мозга или индивидуальный образец пуповинной крови. Достижение таких результатов невозможно без исследования межклеточных взаимодействий в сложной клеточной системе — гемопоэтической нише.

Гемопоэтическая ниша — сложная клеточная система

Естественным микроокружением ГСК является гемопоэтическая ниша, клетки которой активно участвуют в регуляции всех процессов, связанных с поддержанием состояния покоя, деления, самообновления и дифференцировки гемопоэтических клеток. Гемопоэтическая ниша костного мозга является сложной клеточной системой, включающей в себя клетки стromы костного мозга, эндотелиальные клетки, остеоциты, остеобласти, адипоциты, преадипоциты и компоненты внеклеточного матрикса. В нормальных условиях значительная доля ГСК находится в нише в стабильном, неактивном состоянии, и ГСК активируются лишь при необходимости запуска гемопоэза в случае получения соответствующих физиологических сигналов: например, после химиотерапии или кровопотери. Взаимодействие гемопоэтических клеток и ниши костного мозга играет важную роль в запуске сигнальных путей, регулирующих гемопоэз не только в норме, но и в патологических состояниях.

Считается, что существуют две гемопоэтические ниши костного мозга: остеобластная и сосудистая (Zhang et al., 2003; Arai et al., 2005; Jones, Wagers, 2008). В ходе многолетних исследований было показано, что большая часть примитивных гемопоэтических клеток локализована в остеобластной нише костного мозга в окружении стromальных клеток и остеобластов, что стимуляция наращивания остеобластов сопровождалась увеличением числа примитивных ГСК и что взаимодействия ГСК с остеобластами и клетками стромы в нише способствуют поддержанию и самообновлению пула неактивных ГСК. ГСК обнаруживаются и в окружении эндотелиальных клеток синусоидов и перицитов, в сосудистой нише. Предполагают, что эта ниша формирует микроокружение, способствующее пролиферации, дифференцировке и

трансэндотелиальной миграции гемопоэтических клеток (Sugiyama et al., 2006).

Важным различием между этими нишами и модулятором сигнала является уровень кислорода в микроокружении. Очевидно, что в норме в сосудистой нише уровень кислорода существенно выше, чем в остеобластной нише, и различия в уровне содержания кислорода в микроокружении ГСК могут служить для них сигналом к выходу из фазы G₀ клеточного цикла и началу деления и дифференцировки и выхода зрелых клеток в кровоток. Когда потребность организма в зрелых клетках крови удовлетворена, ГСК прекращает делиться, покидает сосудистую нишу, выходит из клеточного цикла и возвращается в остеобластную нишу, где остается в фазе G₀ до следующего сигнала (Heissig et al., 2002; Parmar et al., 2007). Однако, несмотря на проведение большого количества исследований, направленных на изучение межклеточных взаимодействий в кроветворной нише костного мозга, конкретные пути реализации контроля гемопоэза клетками гемопоэтической ниши до сих пор остаются нераскрытыми.

Существующие методы экспансии ГСК *in vitro*

Жидкая культура. В условиях *in vivo* клетки гемопоэтического микроокружения секрецируют цитокины и факторы роста, необходимые для контроля и поддержания гемопоэза. Одним из методов экспансии *in vitro* является культивирование ГСК в среде, содержащей коктейль цитокинов, факторов роста и других веществ, стимулирующих рост клеток. ГСК (CD34⁺ или CD133⁺) выделяют из костного мозга, периферической крови (после мобилизации) или пуповинной крови одним из методов, позволяющих получить препарат, пригодный для клинического использования (например, системой CliniMACS; Miltenyi Biotec, Германия), и культивируют в среде, стимулирующей экспансию. Культивирование производят в различных плашках, специальных мешках или контейнерах. Состав культуральной среды может варьировать, и ее традиционными компонентами являются фактор стволовых клеток (SCF, также KIT-лиганд), интерлейкины 3 и 6, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, тромбоцитопоэтин и лиганд Flt-3. При этом результаты экспансии, проводимой с использованием разных коктейлей цитокинов в разных лабораториях, не всегда коррелируют с концентрацией стимулирующих агентов (Mohamed et al., 2006; Kelly et al., 2009).

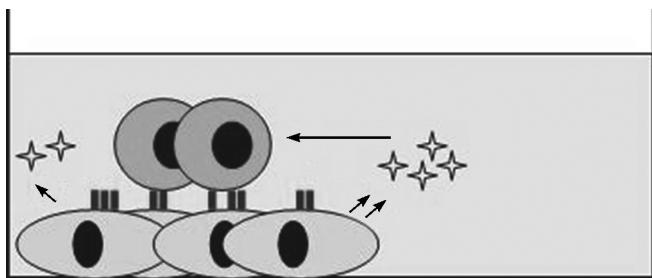


Рис. 1. Схема сложных клеточных систем *in vitro*.

В основе принципа сокульттивирования лежат межклеточные взаимодействия: непосредственные (клеточные контакты; изображены полосками) или опосредованные (секреция фидерными клетками факторов в единую среду; изображены стрелками).

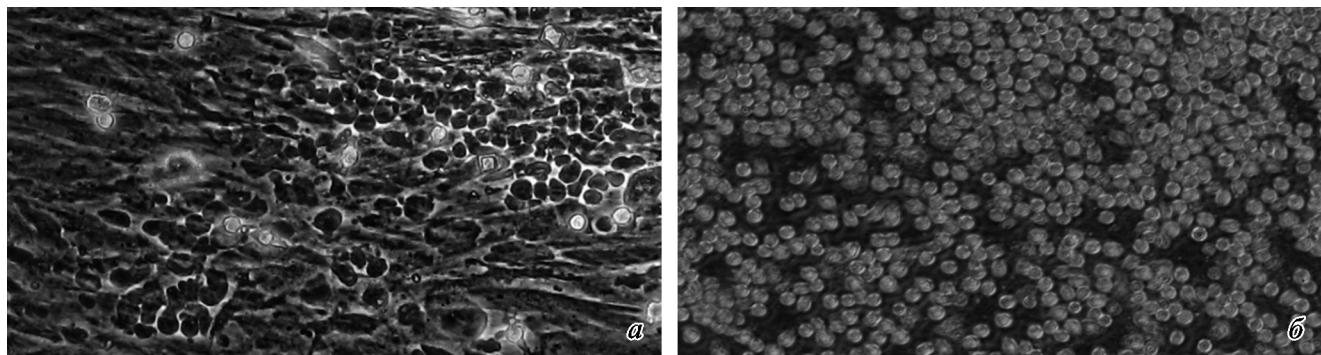


Рис. 2. Сложная клеточная система, состоящая из ГСК и МСК человека.

a — адгезионная фракция ГСК с морфологией булыжной мостовой в области активной пролиферации; *б* — суспензионная фракция ГСК, пролиферирующих вне прямого контакта с фидерными клетками.

Сокульттивирование ГСК с клетками стromы. Недостаток метода экспансии ГСК в жидкой среде очевиден: в данном случае гемопоэтические клетки лишены поддерживающего влияния микроокружения, гемопоэтической ниши, которая, безусловно, вносит свой вклад в регуляцию и поддержание гемопоэза. Иными словами, в данном случае ГСК лишены поддержки микроокружения, и их экспансия поддерживается лишь цитокинами и факторами роста, содержащимися в культуральной среде, зачастую стимулирующими не столько самообновление примитивных ГСК, сколько нежелательную дифференцировку. Сокульттивирование гемопоэтических клеток с мезенхимными стволовыми клетками (МСК) (даже аллогенными) может восстановить некоторые межклеточные взаимодействия, характерные для стромы костного мозга и ГСК в гемопоэтической нише (Kadereit et al., 2002; McNiece et al., 2004). Наличие при контактном сокульттивировании МСК и ГСК центров гемопоэза и участков активного деления гемопоэтических клеток (так называемых островков «булыжной мостовой»), связанных адгезивными взаимодействиями с подложкой МСК, свидетельствует о том, что МСК выполняют не только функцию питающей подложки и секрецируют факторы роста, но и участвуют в регуляции поведения ГСК через непосредственный межклеточный контакт, моделируя таким образом некоторые свойства гемопоэтической ниши (рис. 1).

Исследование закономерностей взаимодействия ГСК с различными типами клеток в пределах гемопоэтической ниши является сложной экспериментальной задачей. Экспериментальной моделью исследования взаимодействий ГСК с различными клетками, входящими в состав гемопоэтической ниши, может быть сокульттивирование с ними ГСК и направленный поиск типов клеток, способных проявлять по отношению к ГСК свойства фидерных (питающих) клеток. Наиболее перспективным является применение МСК, которые обладают фидерными свойствами, высокой пролиферативной активностью и являются более доступными, чем иные типы фидерных клеток (например, дуктальные эпителиоциты или сплиноциты) человеческого происхождения (Анисимов, 2012). Эти факторы определяют возможность экспансии ГСК *in vitro* на аутологичных фидерных клетках, что имеет большое практическое значение.

На разных стадиях гемопоэза существует несколько основных популяций гемопоэтических клеток: 1) малочисленная популяция неактивных, очень медленно делящихся примитивных ГСК, способных поддерживать гем-

опоэз спустя длительное время после трансплантации; обогащение образца для трансплантации именно этой фракцией является особенно важным этапом экспансии *in vitro*; иммунофенотип этих клеток описывают как CD34⁺CD38-CD90⁺; 2) популяция ГСК, способных поддерживать гемопоэз в течение непродолжительного времени после трансплантации — от нескольких недель до нескольких месяцев; их иммунофенотип описывают как CD34⁺CD38-; эта популяция клеток отвечает за увеличение скорости приживления трансплантанта; 3) популяции мультипотентных предшественников (например, предшественники миелоидного ряда), которые также на начальных стадиях развития имеют иммунофенотип CD34⁺CD38-, а на поздних этапах созревания начинают терять экспрессию CD34 и экспрессировать специфичные для данной линии антигены; этапы дальнейшего созревания гемопоэтических клеток включают в себя 4) стадию образования коммитированных предшественников, например клетки, образующие колонии гранулоцитов-макрофагов; 5) стадию образования прекурсоров — клеток со специфичным потенциалом дифференцировки (напри-

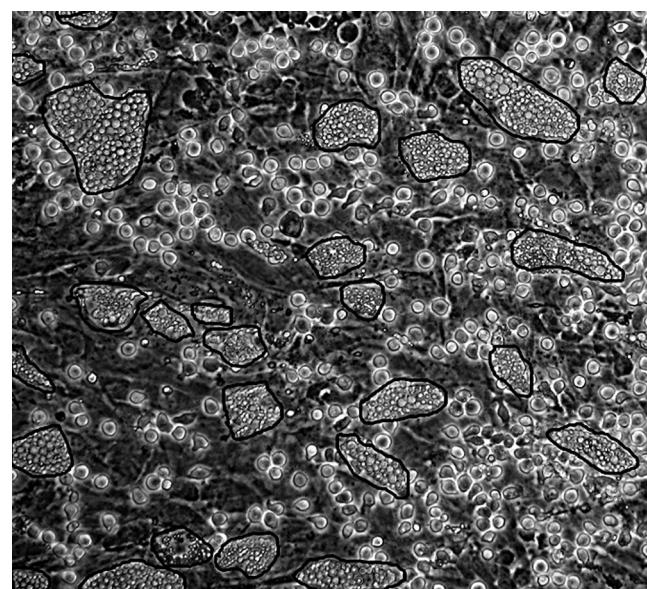


Рис. 3. Участки пролиферирующих ГСК при взаимодействии с фидерным слоем, образованным МСК костного мозга, индуцированных в адипоциты (выделены черным контуром).

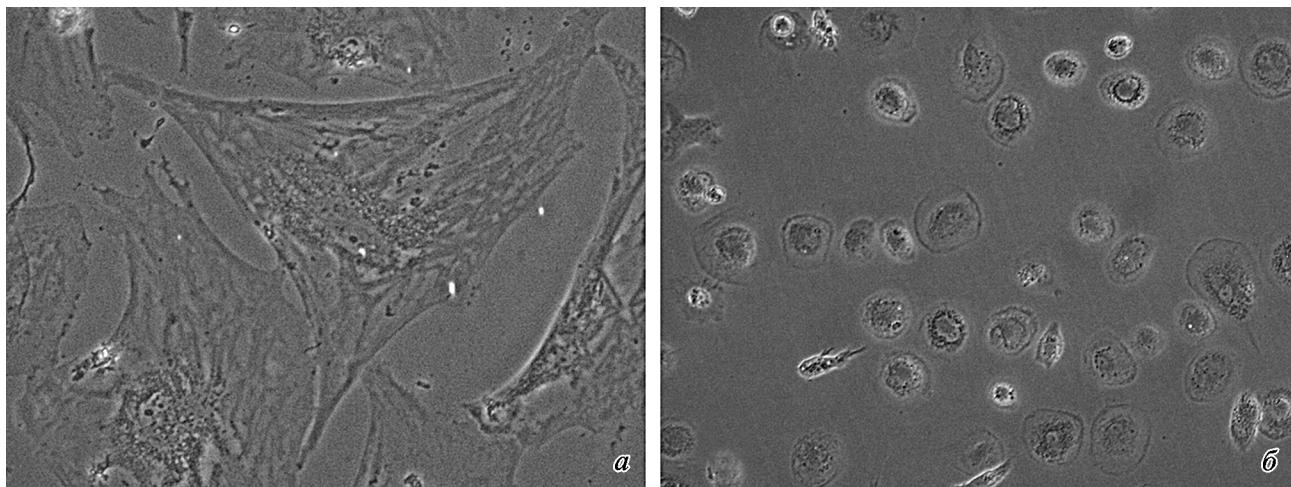


Рис. 4. Первичные культуры дуктальных эпителиоцитов молочной железы (а) и сплиноцитов (б) человека, проявляющих фидерные свойства по отношению к ГСК человека.

мер, клетка-предшественник гранулоцитов) и, наконец, 6) зрелые клетки крови (например, гранулоциты). Таким образом, идеальный протокол экспансии *in vitro* должен обеспечивать оптимальный состав образца для трансплантации: образец должен содержать достаточное количество примитивных ГСК, поддерживающих гемопоэз спустя длительное время после трансплантации, и в то же время должна обеспечиваться достаточная скорость приживления трансплантанта.

В настоящее время проводятся клинические испытания по трансплантации гемопоэтических клеток пуповинной крови после экспансии *in vitro* сокультивированием с МСК, полученных из костного мозга члена семьи пациента в комбинации с трансплантацией необработанных клеток пуповинной крови (Kelly et al., 2009). Предварительные результаты данного исследования представляют большой интерес, однако необходимым является проведение дальнейших исследований, направленных на оптимизацию протоколов экспансии ГСК в сложных клеточных системах, включая исследования эффективности применения разных коктейлей факторов роста, продолжительности и условий сокультивирования гемопоэтических клеток и МСК (например, уровня кислорода). Высокую актуальность имеют также поиск и разработка (в том числе и методами генной инженерии) новых линий стromальных клеток, более эффективно поддерживающих экспансию *in vitro* ГСК при сокультивировании (De Angelis et al., 2004).

Наши собственные исследования подтверждают возможность применения для экспансии ГСК человека *in vitro* фидерных клеток разных типов, включая МСК костного мозга и жировой ткани, в том числе интактных и индуцированных к дифференцировке в адипоцитарном и остеогенном направлениях: в таких опытах нами использовались образцы пуповинной крови и различных тканей человека, включая аспират костного мозга, тимус (вилочковую железу), молочную железу, селезенку и подкожную жировую ткань. На рис. 2, а показан участок имеющей морфологию булыжной мостовой области сложной клеточной системы, состоящей из ГСК и МСК человека и соответствующей зоне активной пролиферации ГСК (точнее, ее адгезионной фракции) в наиболее эффективно действующей модели сокультивирования. Кроме того, в сложных клеточных системах ГСК

пролиферируют также вне прямого контакта с фидерными клетками (сuspensionная фракция, рис. 2, б). Предварительно дифференцированные в адипоцитарном и остеогенном направлениях МСК также сохраняют фидерные свойства в приложении к ГСК человека (рис. 3), хотя и в меньшей степени, чем интактные МСК. При этом собственно экспансия МСК обоих типов не представляет технических сложностей, что позволяет наработать большой объем клеточного материала для сокультивирования с ГСК. Помимо МСК в качестве фидеров могут быть использованы и клетки иных типов: в частности, наличие ограниченных фидерных свойств по отношению к ГСК человека нами выявлено в дуктальных эпителиоцитах молочной железы и сплиноцитах человека (рис. 4), однако клетки таких типов значительно менее доступны, чем МСК, и практически исключают вариант применения аутологичных клеток для экспансии ГСК *in vitro*. Все же такие типы фидерных клеток могут быть полезными для фундаментальных исследований молекулярных механизмов взаимодействия ГСК с компонентами различных типов ниш.

Таким образом, результаты оценки состава популяций ГСК, полученных в ходе экспансии в условиях разработанных к настоящему времени моделей, подтверждают возможность использования для экспансии ГСК человека, в том числе примитивной фракции ГСК CD34⁺CD38⁻, клеток разного происхождения, в том числе интактных и (с меньшей эффективностью) дифференцированных в адипоцитарном и остеогенном направлениях МСК. Раскрытие молекулярно-клеточных механизмов, опосредующих эффективную реализацию МСК их фидерных свойств по отношению к ГСК человека, является интереснейшей научной задачей и требует дальнейших исследований, основанных на применении высокопроизводительных методов из арсенала протеомики и транскриптомики.

Авторы глубоко признательны коллективам Института гематологии и Института молекулярной биологии и генетики Федерального центра сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова Минздравсоцразвития РФ за сотрудничество в работе.

Поисковая научно-исследовательская работа «Разработка технологии экспансии гемопоэтических стволовых

вых клеток человека *in vitro* в сложных клеточных системах, без использования клеток животных» выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг. (Государственный контракт № П810).

Список литературы

- Anisimov C. B. 2012. Ксеногенные риски в применении стволовых клеток. Цитология. 54 (4) : 289—297.
- Anisimov S. V., Morizane A., Correia A. S. 2010. Risks and mechanisms of oncological disease following stem cell transplantation. Stem Cell Rev. 6 : 411—424.
- Arai F., Hirao A., Suda T. 2005. Regulation of hematopoiesis and its interaction with stem cell niches. Int. J. Hematol. 82 : 371—376.
- De Angelis S., Di Liddo R., Buoro S., Toniolo L., Conconi M. T., Belloni A. S., Parnigotto P. P., Nussdorfer G. G. 2004. New immortalized human stromal cell lines enhancing *in vitro* expansion of cord blood hematopoietic stem cells. Int. J. Mol. Med. 13 : 363—371.
- Gluckman E., Rocha V., Arcese W., Michel G., Sanz G., Chan K. W., Takahashi T. A., Ortega J., Filipovich A., Locatelli F., Asano S., Fagioli F., Vowels M., Sirvent A., Laporte J. P., Tiedemann K., Amadori S., Abecassis M., Bordigoni P., Diez B., Shaw P. J., Vora A., Caniglia M., Garnier F., Ionescu I., Garcia J., Koegler G., Rebulla P., Chevret S., Eurocord Group. 2004. Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. Exp. Hematol. 32 : 397—407.
- Gluckman E., Rocha V., Chevret S. 2001. Results of unrelated umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. Rev. Clin. Exp. Hematol. 5: 87—99.
- Heissig B., Hattori K., Dias S., Friedrich M., Ferris B., Hackett N. R., Crystal R. G., Besmer P., Lyden D., Moore M. A., Werb Z., Rafii S. 2002. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. Cell. 109 : 625—637.
- Hodges H., Pollock K., Stroemer P., Patel S., Stevanato L., Reuter I., Sinden J. 2007. Making stem cell lines suitable for transplantation. Cell Transplant. 16 : 101—115.
- Jones D. L., Wagers A. J. 2008. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9 : 11—21.
- Kadereit S., Deeds L. S., Haynesworth S. E., Koc O. N., Kozik M. M., Szekely E., Daum-Woods K., Goetchieus G. W., Fu P., Welniak L. A., Murphy W. J., Laughlin M. J. 2002. Expansion of LTC-ICs and maintenance of p21 and BCL-2 expression in cord blood CD34(+)/CD38(-) early progenitors cultured over human MSCs as a feeder layer. Stem Cells. 20 : 573—582.
- Kelly S. S., Sola C. B. S., de Lima M., Shpall E. 2009. Ex vivo expansion of cord blood. Bone Marrow Transplant. 44 : 673—681.
- McNiece I. 2007. Delivering cellular therapies: lessons learned from *ex vivo* culture and clinical applications of hematopoietic cells. Semin. Cell Develop. Biol. 18 : 839—845.
- McNiece I., Harrington J., Turney J., Kellner J., Shpall E. J. 2004. Ex vivo expansion of cord blood mononuclear cells on mesenchymal stem cells. Cytotherapy. 6: 311—317.
- Mohamed A. A., Ibrahim A. M., El-Masry M. W., Mansour I. M., Khroshted M. A., Gouda H. M., Riad R. M. 2006. Ex vivo expansion of stem cells: defining optimum conditions using various cytokines. Lab. Hematol. 12 : 86—93.
- Parmar K., Mauch P., Vergilio J. A., Sackstein R., Down J. D. 2007. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 104: 5431—5436.
- Rubinstein P., Carrier C., Scaradavou A., Kurtzberg J., Adamson J., Migliaccio A. R., Berkowitz R. L., Cabbad M., Dobrila N. L., Taylor P. E., Rosenfield R. E., Stevens C. E. 1998. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. N. Engl. J. Med. 339 : 1565—1577.
- Sugiyama T., Kohara H., Noda M., Nagasawa T. 2006. Maintenance of the haematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. Immunity. 25 : 977—988.
- Thomas E., Storb R., Clift R. A., Fefer A., Johnson F. L., Neiman P. E., Lerner K. G., Glucksberg H., Buckner C. D. 1975a. Bone-marrow transplantation (first of two parts). N. Engl. J. Med. 292 : 832—843.
- Thomas E. D., Storb R., Clift R. A., Fefer A., Johnson L., Neiman P. E., Lerner K. G., Glucksberg H., Buckner C. D. 1975b. Bone-marrow transplantation (second of two parts). N. Engl. J. Med. 292 : 895—902.
- Zhang J., Niu C., Ye L., Huang H., He X., Tong W. G., Ross J., Haug J., Johnson T., Feng J. Q., Harris S., Wiedemann L. M., Mishina Y., Li L. 2003. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. Nature. 425 : 836—841.

Поступила 21 IX 2012

OPTIONAL PROTOCOLS OF HEMATOPOIETIC STEM CELL EXPANSION *IN VITRO*

R. I. Dmitrieva,¹ S. V. Anisimov^{1, 2}

¹ V. A. Almazov Federal Center for Heart, Blood & Endocrinology and ² Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: renata.i.dmitrieva@gmail.com

Hematopoietic stem cells (HSC) effectively and continuously renew a full spectrum of blood cell populations. Bone marrow and umbilical cord blood stem cells transplantation (SCT) restore hematopoiesis, when used in various hematological and oncohematological disorders in adults and children. However, wider clinical application of effective SCT-based approaches is limited by the low number of the primitive HSC in the available biospecimens. Development of effective protocols for HSC expansion *in vitro* is therefore necessary. In this review, a concept of bone marrow hematopoiesis niche being a complex cellular system is discussed; a comparative analysis of various methods for HSC expansion *in vitro* is provided. The review is illustrated by the authors own data supporting application of various feeder cell types for human HSC expansion *in vitro*.

Key words: hematopoietic stem cells, mesenchymal stem cells, complex cell systems.

Abbreviations: HSC — hematopoietic stem cells.