

ВЛИЯНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КИСЛОРОДА И СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ПОДДЕРЖАНИЕ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ПУПОВИННОЙ КРОВИ

© *Е. В. Сотнезова (Маслова),¹ А. Н. Горностаева,¹ Е. Р. Андреева,¹ Ю. А. Романов,² Е. В. Балашова,² Л. Б. Буравкова^{1,*}*

¹Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, 123007,
²Российский кардиологический научно-производственный комплекс
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 121552;
* электронный адрес: buravkova@imbr.ru

В работе проанализированы морфофункциональные особенности клеток пуповинной крови (КПК) в условиях сокультивирования с мультипотентными мезенхимными стромальными клетками (ММСК) жировой ткани человека при содержании кислорода, пониженном до тканевых значений. Установлено, что ММСК способны поддерживать жизнеспособность КПК при различном содержании кислорода (1, 5 и 20 %). Согласно полученным данным, содержание кислорода в период культивирования влияет на количество колоний, образуемых КПК в селективной среде. В частности, исходные КПК, культивируемые в селективной среде при 1 или 5 % кислорода, образовывали большее количество колоний, чем при 20%-ном содержании O₂. После сокультивирования КПК и ММСК этот результат выявлялся только в случае 5%-ного содержания O₂ и был менее выражен. Наряду с этим при тканевых концентрациях кислорода содержание коммитированных предшественников (КОЕ-Г и КОЕ-М) возрастало, а мульти- и би-потентных (КОЕ-ГЭММ и КОЕ-ГМ) уменьшалось как среди исходных КПК, так и после сокультивирования их с ММСК. Таким образом, наличие стромальных клеток и тканевое содержание кислорода вместе или по отдельности оказывали влияние на КПК *in vitro*.

Ключевые слова: пуповинная кровь, гемопоэтические стволовые клетки, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, сокультивирование, содержание кислорода.

Принятые сокращения: БОЕ — бурсообразующие единицы; ГСК — гемопоэтические стволовые клетки, КОЕ — колониеобразующие единицы, КОЕ-Г — КОЕ гранулоцитов, КОЕ-ГМ — КОЕ гранулоцитов и моноцитов, КОЕ-ГЭММ — КОЕ гранулоцитов, эритроцитов, моноцитов и мегакариоцитов, КОЕ-М — КОЕ моноцитов, КПК — клетки пуповинной крови, ММСК — мультипотентные мезенхимные стромальные клетки,

Пуповинная кровь в настоящее время рассматривается как полноценный источник гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Одним из главных достоинств применения пуповинной крови в качестве альтернативы костному мозгу и мобилизованной периферической крови является возможность неинвазивного получения ГСК. К другим преимуществам пуповинной крови можно отнести ее относительно легкую доступность, безопасность получения для донора и меньшую (по сравнению с использованием костного мозга и ГСК периферической крови) частоту и тяжесть развития реакции «трансплантат против хозяина», что позволяет использовать клетки пуповинной крови (КПК) с большей степенью несоответствия по антигенам системы главного комплекса гистосовместимости, чем при трансплантации костного мозга (Broxmeyer, 2005; Gluckman, Rocha, 2009).

Открытым остается вопрос о судьбе КПК в костном мозге реципиента. Это связано с тем, что в условиях периферического кровотока (в крови плода и пуповинной крови) ГСК и прогениторные клетки находятся в отсутст-

вие каких-либо контактов в отличие от костного мозга, где ГСК взаимодействуют со стромальными элементами. Кроме того, содержание кислорода, характерное для расположения стволовых клеток в костном мозге, составляет 1—2 % (Chow et al., 2001; Harrison et al., 2002; Parmar et al., 2007), в пупочной вене после нормальных родов — 3—5 % (Lackman et al., 2001), а в плаценте — 8—10 % (Jauniaux et al., 2000; Sullivan et al., 2006). Показано, что низкое парциальное давление кислорода оказывает существенное влияние на гемопоэтические и стромальные клетки, а также их взаимодействие. Однако работы, демонстрирующие роль кислорода во взаимодействии клеток гемопоэтического и стромального дифференцирования, проведенные в основном на предшественниках, полученных из костного мозга (Cipolleschi et al., 1993; Danet et al., 2003). Таким образом, влияние факторов костномозгового микроокружения на клетки ПК изучено недостаточно.

Использование ММСК в качестве фидерного подслоя для культивирования гемопоэтических клеток является традиционным и наиболее адекватным подходом (Заха-

ров, 1991; McNiece et al., 2004; Corre et al., 2006; Kilroy et al., 2007; Жамбалова и др., 2009; Nakao et al., 2010; De Toni et al., 2011; Петёвка и др., 2012). Показано, что стромальные клетки костного мозга в Dexter-культурах могут поддерживать кроветворение *in vitro* более 6 мес (Dexter et al., 1977). ММСК из стромально-васкулярной фракции жировой ткани являются хорошей альтернативой ММСК из костного мозга, и в настоящее время свойства этих клеток активно изучаются. Было показано, что ММСК из жировой ткани человека, так же как и ММСК из костного мозга, способны поддерживать гемопоэз *in vitro* (Corre et al., 2006). Совместное культивирование ММСК из жировой ткани с КПК не только позволит исследовать особенности взаимодействия гемопоэтических и стромальных клеток в условиях содержания кислорода 1 и 5 %, но также сможет в дальнейшем использоваться при разработке методик, направленных на обогащение гемопоэтическими предшественниками трансплантатов пуповинной крови *ex vivo*.

Целью данной работы стало исследование морфофункциональных особенностей ядродержащих КПК при моделировании некоторых факторов их микроокружения: в присутствии ММСК из стромально-васкулярной фракции жировой ткани и при пониженном содержании кислорода (1 и 5 %).

Материал и методика

ММСК выделяли из подкожной жировой клетчатки человека. Первичную культуру ММСК получали по описанному методу (Zuk et al., 2002) в модификации Буравковой с коллегами (2009). ММСК культивировали в условиях атмосферного (20 %) и тканевого (1 и 5 %) содержания кислорода. В работе использовали клетки 3—5-го пассажей. Перед проведением эксперимента ММСК инкубировали 18 ч в присутствии митомicina C (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1.5 мкг/мл для остановки деления клеток, а затем пересевали на чашки Петри (35 мм) с плотностью, позволяющей получить 70—80%-ный монослой. Через 24 ч культивирования ММСК использовали для экспериментов.

Криоконсервированные образы ядродержащих КПК были предоставлены Банком стволовых клеток «КриоЦентр» (Москва). Заготовку пуповинной крови проводили с письменного информированного согласия обследованных здоровых рожениц в акушерских отделениях Научного центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова. Кровь собирали в мешки донорской системы с антикоагулянтом ЦФДА-1 и использовали для выделения ядродержащих клеток в течение 24 ч. Выделение КПК проводили методом двойного центрифугирования в соответствии с зарегистрированной медицинской технологией (ФС № 2009/387 от 23.11.2009 г.). После седиментации эритроцитов и удаления избытка плазмы фракцию ядродержащих клеток ресуспендировали в аутологичной плазме, добавив 10 % диметилсульфоксида (Sigma, США) и 1 % декстрана-40, расфасовывали в криопробирки и подвергали программному замораживанию до конечной температуры -90°C в соответствии со стандартными операционными процедурами Банка пуповинной крови.

В день эксперимента КПК размораживали на водяной бане при 37°C и отмывали от криопротектора в избытке среды культивирования RPMI 1640 (Gibco, США), содер-

жащей 2 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, HyClone, США). После оценки жизнеспособности в тесте с трипановым синим концентрацию КПК доводили до $(1.5\text{—}2.5) \cdot 10^6$ кл./мл в полной среде культивирования (RPMI 1640, содержащей 10 % ЭТС, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Биолот, Россия)) и использовали в течение 30 мин. Суспензию КПК наслаивали на слой ММСК из расчета $(391\text{—}651) \cdot 10^3$ кл./см², затем культивировали в течение 72 ч при 1, 5 или 20 % O₂.

Наличие колониеобразующих единиц (КОЕ) оценивали по способности клеток образовывать колонии в полужидкой среде, содержащей коктейль цитокинов и факторов роста ГСК (MethoCult H4034, STEMCELL Technologies, Канада). Суспензию КПК вносили в среду из расчета $(3\text{—}5) \cdot 10^4$ клеток на 1 чашку Петри диаметром 35 мм и культивировали в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Для сравнения использовали исходные (после разморозки) КПК, взятые в той же концентрации. Культивирование проводили при 1, 5 и 20 % O₂ (5 % CO₂, 37 °C, влажность 100 %). Клетки, полученные после сокультивирования с ММСК, культивировали в полужидкой среде при таком же содержании кислорода, что и в совместной культуре. Число и состав колоний оценивали через 14 сут.

Для проточной цитофлуориметрии отбирали по 100 мкл конечной суспензии, содержащей 200—300 тыс. клеток. В работе использовали ФИТЦ- или фикоэритрин (ФЭ)-конъюгированные антитела к антигенам человека CD3, CD45, CD19, CD16, CD56, HLA-DR, CD25 и CD69 (Beckman Coulter, США). В качестве изотипического контроля использовали ФИТЦ- или ФЭ-конъюгированные иммуноглобулины того же подкласса, что и антитела. Анализ экспрессии антигенов проводили на проточном цитофлуориметре Coulter Epics XL (Beckman Coulter, США).

Выявление апоптотических и некротических клеток в суспензионной фракции КПК проводили с использованием набора ANNEXIN V KIT FITC/PI (Invitrogen, США) на цитофлуориметре Coulter Epics XL. Количество и жизнеспособность адгезированных клеток определяли с помощью одновременного окрашивания флуоресцеиндиацетатом (ФДА, Sigma, США) и иодидом пропидия (PI, Invitrogen, США) в конечных концентрациях 0.05 и 300 мкг/мл соответственно. Анализ жизнеспособности проводили на флуоресцентном микроскопе Nikon Eclipse TiU. Живые и мертвые клетки различали по наличию зеленой (ФДА, $\lambda_{\text{возб./исп.}} = 470/515$ нм) и красной (PI, $\lambda_{\text{возб./исп.}} = 535/590$ нм) флуоресценции. В каждой культуре анализировали не менее 5 случайно выбранных полей зрения площадью 0.6 мм² каждое. Дальнейшую обработку изображений проводили в программе NIS-elements (Nikon, Япония).

Для гистологического анализа мазки или стекла с клетками фиксировали ледяным метанолом в течение 5 мин и окрашивали раствором красителя Гимза (AppliChem, Германия) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. После окрашивания и высушивания образцы заключали в среду Poly-Mount. Препараты изучали в том же микроскопе. Для идентификации клеток гематогенного происхождения использовали гематологический атлас (Абрамов, 1985).

В качестве характеристик полученных выборок использовали среднее, стандартную ошибку среднего, медиану и разброс. Учитывая небольшое число исследованных образцов и выявленную высокую индивидуальную вариабельность показателей, статистическую достовер-

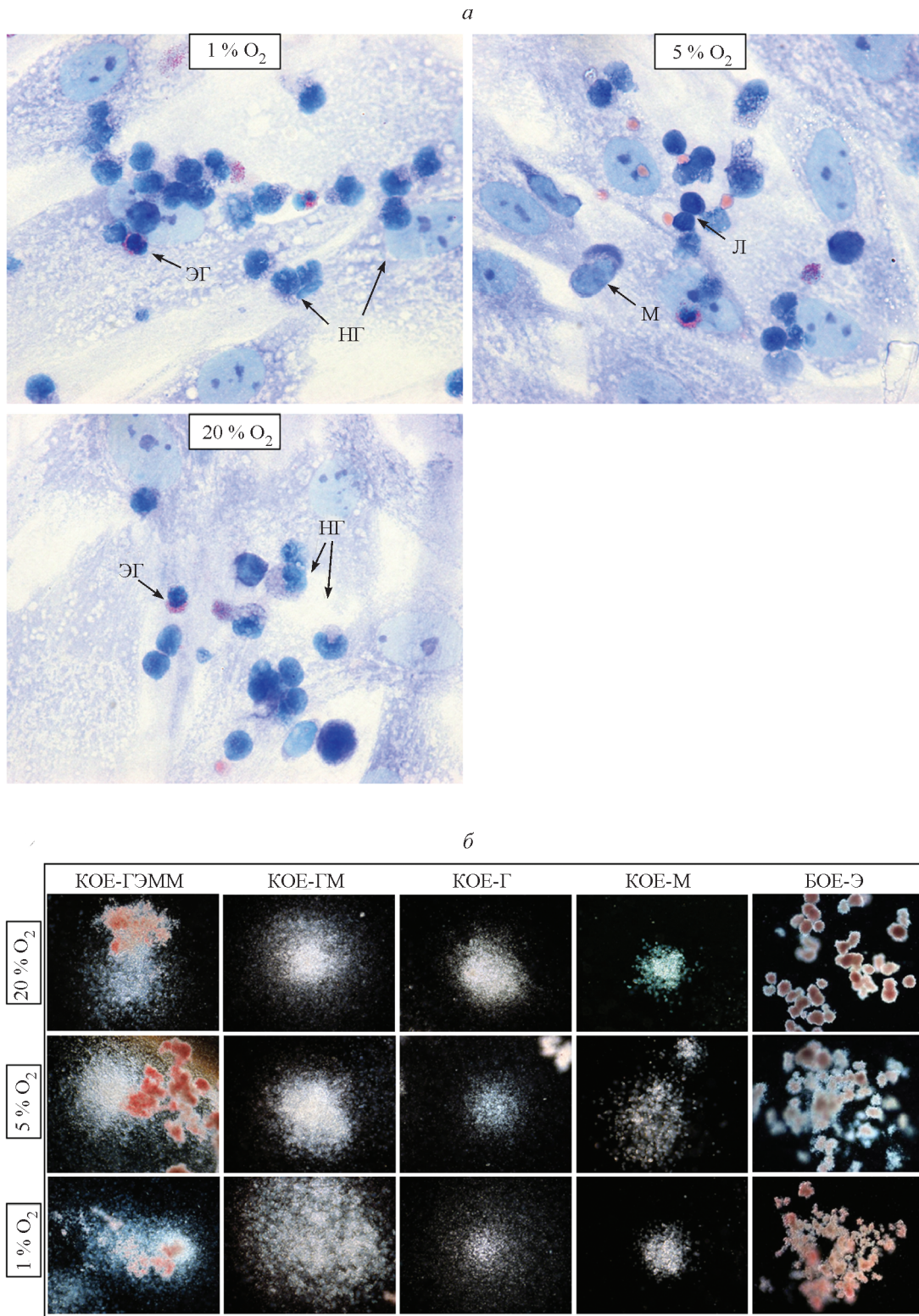


Рис. 1. Клетки пуповинной крови (КПК) через 72 ч совместного культивирования с ММСК в условиях различного содержания кислорода.

a — клетки, адгезирующие на слой ММСК (краситель Гимза); *b* — гемопоэтические колонии, полученные из КПК в среде MethoCult H4034. Л — лимфоцит, М — моноцит, НГ — нейтрофильный гранулоцит, ЭГ — эозинофильный гранулоцит. Об. 60× (*a*) и 4× (*b*).

ность различий между группами оценивали с помощью непараметрического критерия Манна—Уитни (для малых и средних выборок). Различия считали достоверными при $P < 0.05$. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 7.0 и пакета программ Microsoft Excel 2000.

Результаты

При совместном культивировании с ММСК из жировой ткани человека КПК адгезировали к ним и сохраняли высокий уровень жизнеспособности (от 61.5 до 90.1%, $Me = 86.4\%$). Через 72 ч медиана количества адгезировавших КПК соответствовала $44.5 \cdot 10^3$ кл./см² (разброс от $39.9 \cdot 10^3$ до $69.8 \cdot 10^3$ кл./см²). Часть КПК прикреплялась к поверхности ММСК, другие мигрировали под монослой. Такое распределение было характерно и для культивирования в условиях содержания O_2 1 и 5%. В условиях тканевого содержания кислорода медиана количества адгезировавших клеток составила $63.7 \cdot 10^3$ кл./см² ($31.4 \cdot 10^3$ — $89.6 \cdot 10^3$) при 1% O_2 и $78.6 \cdot 10^3$ кл./см² ($19.0 \cdot 10^3$ — $98.5 \cdot 10^3$) при 5% O_2 ; при этом медиана количества жизнеспособных КПК составляла 64.3 (46.3—70.5%) и 91.3% (40.8—91.3%) соответственно.

Жизнеспособность КПК, находящихся в суспензии над слоем ММСК, оставалась на уровне, сопоставимом с исходным, а изменение их числа происходило только за счет адгезии.

Через 72 ч сокультивирования некоторые КПК, адгезировавшие к стромальному подслою, имели хорошо распластанный вид с отростками; другие клетки, наоборот, выглядели более компактными. Нередко наблюдалось смещение ядра к краю клетки. На поверхности ММСК обнаруживались отдельно лежащие гранулы из разрушенных эозинофильных гранулоцитов. Среди адгезированных КПК были выявлены преимущественно предшественники гранулоцитов (рис. 1, а). Нейтрофильные и эозинофильные гранулоциты имели несегментированные ядра, что свидетельствовало об их незрелости. Клетки с узким ободком базофильной цитоплазмы соответствовали по морфологии лимфоцитам, однако также могли являться незрелыми бластными клетками. В культуре также встречались моноцитарные клетки с крупными ядрами и предшественники эритроидного ряда разной степени дифференцированности (базо-, полихромато- и оксифильные эритробласты) (рис. 1, а). В суспензионной фракции состав клеток был аналогичен адгезировавшим КПК. Морфологических различий КПК в зависимости от концентрации кислорода в среде культивирования отмечено не было.

Количество колоний, образованных КПК в селективной среде (рис. 1, б), зависело от содержания кислорода в период культивирования. Исходные КПК, культивируемые в полужидкой среде при 1 или 5% кислорода, образовывали большее количество колоний, чем при 20% O_2 . После сокультивирования этот результат выявлялся только при 5% O_2 и был менее выражен (рис. 2).

При анализе субпопуляционного состава КОЕ из КПК была выявлена тенденция к образованию меньшего количества колоний КОЕ-ГЭММ (гранулоцитарно-эритроидно-моноцитарно-мегакариоцитарных) и КОЕ-ГМ (гранулоцитарно-моноцитарных) в условиях пониженного содержания кислорода в сравнении с 20%-ным его содержанием (табл. 1), число моноцитарных колоний (КОЕ-М) при 1% O_2 было значимо большим.

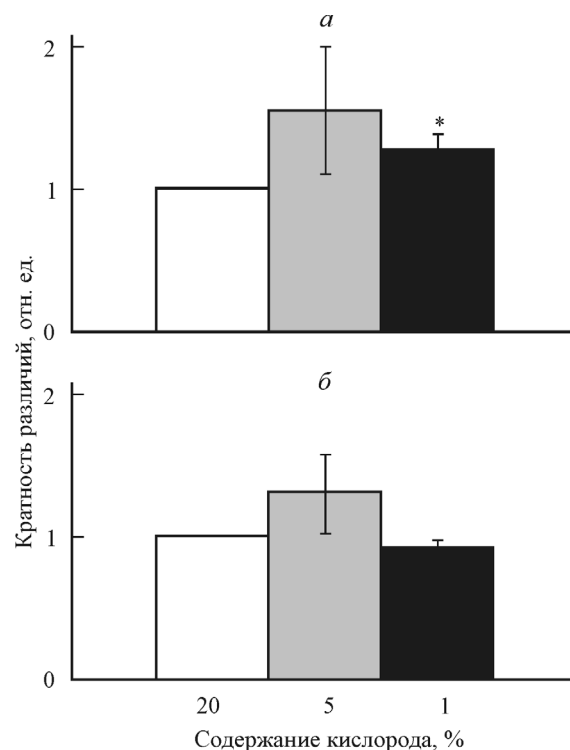


Рис. 2. Влияние концентрации кислорода на количество КОЕ среди КПК до (а) и после (б) культивирования на слое ММСК.

За единицу принято количество КОЕ при 20%-ном содержании O_2 . Даны средние значения и их ошибки ($n = 4-7$); звездочка показывает достоверность отличий от значений при 20% O_2 , $P < 0.05$.

Сокультивирование КПК с ММСК в течение 72 ч приводило к появлению еще больших различий в субпопуляционном составе КОЕ в зависимости от содержания кислорода (табл. 1). По сравнению с 20%-ным содержанием O_2 при тканевом его содержании формировалось меньше смешанных колоний (КОЕ-ГМ) и больше гранулоцитарных (КОЕ-Г) и моноцитарных (КОЕ-М) (табл. 1). Доля эритроидных бурстообразующих единиц (БОЕ-Э) в условиях тканевого содержания кислорода значимо не отличалась от таковой в стандартных условиях культивирования. Однако при понижении концентрации O_2 в среде культивирования размер клона в поликлональных колониях уменьшался (рис. 1, б).

Таким образом, тканевые концентрации кислорода способствовали формированию колоний более коммитированных предшественников, причем в условиях 1%-ного содержания O_2 преобладали макрофагальные колонии, а в условиях 5%-ного — гранулоцитарные. После сокультивирования КПК с ММСК эта зависимость не только сохранялась, но и усиливалась.

Несмотря на относительно высокое содержание ГСК, пуповинная кровь представляет собой периферическую кровь новорожденных и содержит зрелые клеточные элементы, характерные для периферической крови взрослого человека. По-видимому, сокультивирование КПК со стромальными предшественниками может повлиять на состояние не только гемопоэтических предшественников, но и на их дифференцированные производные.

Через 72 ч сокультивирования в суспензии КПК, находящейся над подслоем ММСК, изменялся популяционный состав лимфоцитов за счет уменьшения доли В-клеток и естественных киллерных (ЕК) клеток (рис. 3). Суб-

Таблица 1

Количество гемопоэтических колоний различного типа среди исходных КПК и после их сокультивирования с ММСК при различном содержании кислорода

КОЕ	Доля от общего числа КОЕ (%) при разном содержании O ₂		
	1 %	5 %	20 %
Исходные КПК			
КОЕ-ГЭММ	1.2 ± 0.6	2.1 ± 0.7	4.1 ± 1.5
КОЕ-Г	16.6 ± 6.1	18.7 ± 4.5	18.3 ± 2.7
КОЕ-М	20.1 ± 4.2 ^a	7.5 ± 1.8	8.3 ± 2.9
КОЕ-ГМ	4.6 ± 1.7	5.1 ± 0.7	8.0 ± 2.0
БОЕ-Э	57.5 ± 5.6	66.7 ± 4.8	61.4 ± 2.8
После сокультивирования			
КОЕ-ГЭММ	1.0 ± 1.0	2.9 ± 0.6	2.4 ± 0.8
КОЕ-Г	30.0 ± 9.5	24.9 ± 5.0 ^a	11.6 ± 3.2
КОЕ-М	17.5 ± 2.4 ^a	9.1 ± 2.4	6.5 ± 2.1
КОЕ-ГМ	2.3 ± 0.7 ^a	3.4 ± 1.0 ^a	7.0 ± 1.2
БОЕ-Э	49.2 ± 10.4	59.7 ± 7.5	72.5 ± 4.3

Примечание. Представлены средние и их ошибки (n = 3—7). ^a Достоверность отличия от значений при 20%-ном содержании O₂ (P < 0.05).

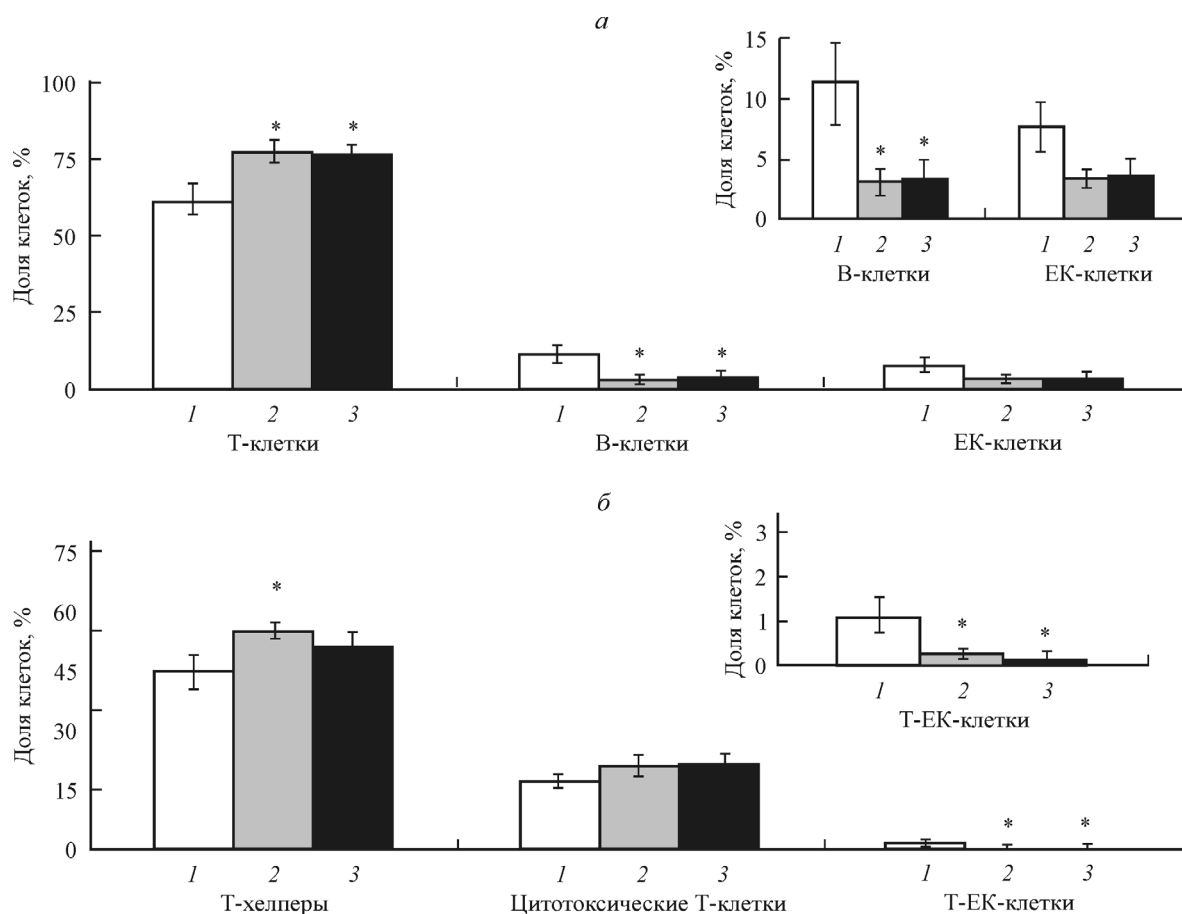


Рис. 3. Иммунофенотип КПК до (столбцы 1) и после сокультивирования с мультипотентными мезенхимными стромальными клетками (ММСК) в условиях 5%-ного (столбцы 2) и 20%-ного (столбцы 3) содержания кислорода. Популяции лимфоцитов (а) и субпопуляции Т-клеток (б).

Даны средние значения и их ошибки (n = 6); звездочка показывает достоверность отличий от исходного значения P < 0.05. На врезках показаны те же группы клеток, но при меньшем масштабе по вертикали.

Таблица 2

Экспрессия маркеров активации Т-клетками пуповинной крови

Клетки и содержание O ₂	Доля Т-клеток с маркерами активации, %		
	CD3 ⁺ /HLA-DR	CD3 ⁺ /CD69 ⁺	CD3 ⁺ /CD25 ⁺
КПК	0.03—0.28 (0.10)	0.36—22.00 (3.50)	1.49—5.65 (4.19)
КПК + ММСК, 5 %	0.00—0.15 (0.07)	0.12—12.90 (1.12)	1.67—9.80 (2.72)
КПК + ММСК, 20 %	0.08—0.25 (0.12)	0.14—4.54 (0.92)	1.30—6.68 (2.90)

Примечание. В скобках указана медиана.

популяционный состав Т-клеток также претерпевал изменения, что было связано со значительным уменьшением доли клеток Т-ЕК (рис. 3). При оценке экспрессии молекул, характеризующих активацию Т-клеток (CD69, CD25 и HLA-DR), наблюдалась тенденция к уменьшению доли клеток CD69⁺ и CD25⁺, при этом доля клеток HLA-DR⁺ не изменялась (табл. 2). Также было отмечено уменьшение доли моноцитов (CD45⁺/CD14⁺), что обусловлено, по-видимому, активной адгезией этих клеток на подслое ММСК. На популяционный состав лимфоцитов содержание кислорода в среде культивирования не влияло.

Таким образом, сокультивирование КПК с ММСК сопровождалось значительным уменьшением доли лимфоцитов, которым для активации не требуется презентация антигенов другими клетками (Т и ЕК), а также уменьшением доли Т-клеток, несущих маркеры активации CD25 и CD69. Подобные изменения популяционного состава, по-видимому, определяются особенностями взаимодействия различных популяций лейкоцитов пуповинной крови с ММСК, в частности преимущественной адгезией В-клеток, ЕК-клеток, а также Т-клеток, несущих маркеры активации. Полученные результаты позволяют сделать предположение о том, что подобным образом может проявляться иммуносупрессивное действие ММСК, хорошо описанное в отношении зрелых клеток периферической крови.

Обсуждение

Более 20 лет назад успешное использование КПК положило начало развитию области исследований, связанных с их заготовкой, хранением, амплификацией и применением в различных областях медицины (Ballen et al., 2013).

Эффективность применения КПК была продемонстрирована в отношении многих заболеваний и патологических состояний, однако механизм воздействия и судьба клеток в организме реципиента изучены недостаточно. Известно, что после трансплантации КПК могут подвергаться направленному хоумингу, в том числе и в костный мозг. В этой связи интерес к процессам, происходящим с КПК в условиях кроветворного микроокружения, очевиден. Поскольку проведение подобных исследований в костном мозге человека *in vivo* невозможно, представляется интересным создание адекватных клеточных моделей *in vitro*. В нашей работе для изучения свойств КПК в условиях кроветворного микроокружения была смоделирована гемопоэтическая ниша, в которой содержание кислорода соответствовало тканевым значениям (1 или 5 %), а в качестве стромального компонента использованы ММСК из жировой ткани.

Несмотря на сходство ММСК из разных источников, они оказывают различное влияние на свойства сокультивируемых с ними гемопоэтических клеток. Показано, что ММСК из жировой ткани способны поддерживать примитивные гемопоэтические предшественники с меньшей эффективностью, чем ММСК из костного мозга (Kilroy et al., 2007; Wagner et al., 2007; De Toni et al., 2011). Вместе с тем ММСК из жировой ткани способствуют дифференцировке ГСК и более эффективно поддерживают дифференцированные гемопоэтические предшественники (Nakao et al., 2010; De Toni et al., 2011). Данные, полученные в исследованиях *in vivo*, свидетельствуют о том, что ММСК из жировой ткани человека при совместном введении с ГСК значительно увеличивают хоуминг гемопоэтических предшественников и снижают смертность у летально облученных мышей после трансплантации (Nakao et al., 2010). В настоящей работе впервые показано, что ММСК из стромально-васкулярной фракции жировой ткани при концентрациях кислорода 1, 5 и 20 % способны поддерживать жизнеспособность КПК, в том числе и гемопоэтических предшественников.

При внесении суспензии клеток костного мозга на слой из стромальных клеток часть гемопоэтических клеток адгезирует к подложке и (или) мигрирует под нее, другая часть остается в суспензии над ней (Dexter et al., 1977; Wagner et al., 2007; Jing et al., 2010). Мы наблюдали аналогичное распределение при совместном культивировании КПК и ММСК из жировой ткани. Пониженное содержание кислорода при этом не влияло на жизнеспособность и динамику прикрепления КПК к подслою ММСК. Все это свидетельствует о том, что ММСК выполняют не только функцию питающей подложки, но и через непосредственные межклеточные контакты регулируют поведение ГСК, демонстрируя тем самым свойства костномозгового микроокружения. Присутствие клеток разной степени зрелости, также находящихся в контакте со стромой, и собственно клеток стромы создавало естественное микроокружение для гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток.

Пространственная организация ГСК в совместной культуре сопоставима с их распределением в костном мозге: клетки располагаются в областях с различным содержанием кислорода и доступа питательных веществ в зависимости от состояния — покоя или активной пролиферации. Так, среди фракции клеток, адгезирующих на поверхность ММСК, была выявлена наибольшая доля активно пролиферирующих клеток, в то время как клетки, мигрировавшие под стромальный слой, делились редко и сохраняли незрелый фенотип (Jing et al., 2010). Благодаря способности ГСК занимать определенное положение в сокультуре в зависимости от пролиферативного потенциала становятся возможными их фракциониро-

вание и выделение популяции клеток с определенными свойствами (Маслова и др., 2013).

Содержание кислорода не только влияет на распределение клеток в совместной культуре, но также определяет пролиферативный потенциал ГСК. Известно, что низкий уровень кислорода (5 %) способствует пролиферации культивируемых КОЕ (Roy et al., 2002). В наших экспериментах два фактора (строма и тканевой уровень содержания кислорода) вместе или по отдельности влияли на гемопоэтические КОЕ из пуповинной крови. В частности, происходило смещение соотношения типов КОЕ в сторону более коммитированных предшественников (КОЕ-Г и КОЕ-М) и уменьшения смешанных колоний (КОЕ-ГЭММ, КОЕ-ГМ). По-видимому, такой эффект достигался за счет уменьшения окислительного повреждения и увеличения восприимчивости к ростовым факторам, таким как эритропоэтин и макрофагальный колониестимулирующий фактор, в условиях пониженного до тканевых уровней содержания кислорода в среде культивирования (Noll et al., 2002).

Таким образом, при совместном культивировании ММСК из жировой ткани поддерживают жизнеспособность и способность к адгезии различных популяций КПК, включая гемопоэтические предшественники. Снижение содержания кислорода до тканевых значений изменяет соотношение КОЕ различных кроветворных ростков, способствуя образованию колоний из более коммитированных предшественников (КОЕ-Г и КОЕ-М).

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий» и стипендии президента РФ (СП-3502.2015.4).

Список литературы

- Абрамов М. Г. 1985. Гематологический атлас. М.: Медицина. 344 с. (Abramov M.G. 1985. Hematological Atlas. M.: Meditsina. 344 p.)
- Буравкова Л. Б., Гринаковская О. С., Андреева Е. П., Жамбалова А. П., Козионова М. П. 2009. Характеристика мезенхимных стромальных клеток из липоаспирата человека, культивируемых при пониженном содержании кислорода. Цитология. 51 (1) : 5—11. (Buravkova L. B., Grinakovskaya O. S., Andreeva E. P., Zhabalova A. P., Kozionova M. P. 2009. Characteristics of human lipoaspirate-isolated mesenchymal stromal cells cultivated under a lower oxygen tension. Cell Tissue Biol. 3 (1) : 23—28.)
- Жамбалова А. П., Даревская А. Н., Кабаева Н. В., Романов Ю. А., Буравкова Л. Б. 2009. Особенности взаимодействия культивируемых мезенхимальных и гемопоэтических стволовых клеток человека в условиях пониженного содержания кислорода. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2 : 89—95. (Zhabalova A. P., Darevskaya A. N., Kabaeva N. V., Romanov Y. A., Buravkova L. B. 2009. Specific interaction of cultured human mesenchymal and hemopoietic stem cells under conditions of reduced oxygen content. Bull. Exp. Biol. Med. 147 (4) : 525—530.)
- Захаров Ю. М. 1991. Современный взгляд на регуляцию кроветворения. Патол. физиол. эксперим. терапия. 12 : 91—101. (Zakharov Yu. M. 1991. The modern view of the regulation of hematopoiesis. Pathol. Physiol. Exp. Ther. 12 : 91—101.)
- Маслова Е. В., Андреева Е. П., Андрианова И. В., Бобылева П. И., Романов Ю. А., Кабаева Н. В., Балашова Е. Е., Ряскина С. С., Дугина Т. Н., Буравкова Л. Б. 2013. Обогащение мононуклеаров пуповинной крови гемопоэтическими клетками-предшественниками в совместной культуре с мезенхимальными стромальными клетками жировой ткани человека. Клеточ-

ные технологии в биологии и медицине. 4 : 238—243. (Maslova E. V., Andreeva E. P., Andrianova I. V., Bobileva P. I., Romanov Y. A., Kabaeva N. V., Balashova E. E., Ryaskina S. S., Dugina T. N., Buravkova L. B. 2014. Enrichment of umbilical cord blood mononuclears with hemopoietic precursors in co-culture with mesenchymal stromal cells from human adipose tissue. Bull. Exp. Biol. Med. 156 (4) : 584—589.)

Петёвка Н. В., Гончарова Н. В., Северин И. Н., Космачева С. М., Потанин М. П. 2012. Пролиферация и дифференцировка предшественников миелоидного ростка кроветворения пуповинной крови человека при экспансии *in vitro*. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 7 (1) : 40—48. (Petevka N. V., Goncharova N. V., Severin I. N., Kosmacheva S. M., Potanin M. P. 2012. *In vitro* expansion and lineage commitment of the umbilical cord blood myeloid progenitors. Cell. Transplant. Tissue. Eng. 7 (1) : 40—48.)

Ballen K. K., Gluckman E., Broxmeyer H. E. 2013. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. Blood. 122 : 491—498.

Broxmeyer H. E. 2005. Biology of cord blood cells and future prospects for enhanced clinical benefit. 7 : 209—218.

Chow D. C., Wenning L. A., Miller W. M., Papoutsakis E. T. 2001. Modeling p(O₂) distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. Biophys. J. 81 : 685—696.

Cipolleschi M. G., Sbarba P. D., Olivetto M. 1993. The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. Blood. 82 : 2031—2037.

Corre J., Barreau C., Cousin B., Chavoïn J. P., Caton D., Fournier G., Penicaud L., Casteilla L., Laharrague P. 2006. Human subcutaneous adipose cells support complete differentiation but not self-renewal of hematopoietic progenitors. J. Cell. Physiol. 208 : 282—288.

Danet G. H., Pan Y., Luongo J. L., Bonnet D. A., Simon M. C. 2003. Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. J. Clin. Invest. 112 (1) : 126—135.

De Toni F., Poglio S., Youcef A. B., Cousin B., Pflumio F., Borurin P., Casteilla L., Laharrague P. 2011. Human adipose-derived stromal cells efficiently support hematopoiesis *in vitro* and *in vivo*: a key step for therapeutic studies. Stem Cells Develop. 20 : 2127—2138.

Dexter T. M., Allen T. D., Lajtha L. G. 1977. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells *in vitro*. J. Cell. Physiol. 91 : 335—344.

Gluckman E., Rocha V. 2009. Cord blood transplantation: state of the art. Haematologica. 94 : 451—454.

Harrison J. S., Rameshwar P., Chang V., Bandari P. 2002. Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. Blood. 99 : 394

Jauniaux E., Watson A. L., Hempstock J., Bao Y. P., Skepper J. N., Burton G. J. 2000. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. Amer. J. Pathol. 157 : 2111—2122.

Jing D., Fonseca A. V., Alakel N., Fierro F. A., Muller K., Bornhauser M., Ehninger G., Corbeil D., Ordemann R. 2010. Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cell-modeling the niche compartments *in vitro*. Haematologica. 95 : 542—550.

Kilroy G. E., Foster S. J., Wu X., Ruiz J., Sherwood S., Heifetz A., Ludlow J. W., Stricker D. M., Potiny S., Green P., Halvorsen Y. D., Cheatham B., Storms R. W., Gimble J. M. 2007. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. J. Cell. Physiol. 212 : 702—709.

Lackman F., Capewell V., Gagnon R., Richardson B. 2001. Fetal umbilical cord oxygen values and birth to placental weight ratio in relation to size at birth. Amer. J. Obstet. Gynecol. 185 : 674—682.

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.

Nakao N., Nakayama T., Yahata T., Muguruma Y., Saito S., Miyata Y., Yamamoto K., Naoe T. 2010. Adipose tissue-derived

mesenchymal stem cells facilitate hematopoiesis *in vitro* and *in vivo*: advantages over bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Amer. J. Pathol.* 177 : 547—554.

Noll T., Jelinek N., Schmid S., Biselli M., Wandrey C. 2002. Cultivation of hematopoietic stem and progenitor cells: biochemical engineering aspects. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 74 : 111—128.

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.

Roy S., Tripathy M., Mathur N., Jain A., Mukhopadhyay A. 2012. Hypoxia improves expansion potential of human cord blo-

od-derived hematopoietic stem cells and marrow repopulation efficiency. *Eur. J. Haematol.* 88 : 396—405.

Sullivan M., Galea P., Latif S. 2006. What is the appropriate oxygen tension for *in vitro* culture? *Mol. Hum. Reprod.* 12 : 653.

Wagner W., Wein F., Roderburg C., Saffrich R., Faber A., Krause U., Schubert M., Benes V., Eckstein V., Maul H., Ho A. D. 2007. Adhesion of hematopoietic progenitor cells to human mesenchymal stem cells as a model for cell-cell interaction. *Exp. Hematol.* 35 : 314—325.

Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell.* 13 : 4279—4295.

Поступила 18 III 2015

EFFECT OF STROMAL CELLS AND OXYGEN CONCENTRATION ON THE MAINTENANCE OF CORD BLOOD HEMATOPOIETIC PRECURSORS

*E. V. Sotnezova (Maslova),¹ A. N. Gornostaeva,¹ E. R. Andreeva,¹ Yu. A. Romanov,² E. E. Balashova,² L. B. Buravkova^{1, *}*

¹Institute of Biomedical Problems RAS, Moscow, 123007,

and ²National Complex of Cardiology Research and Practice, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 121552;

* e-mail: buravkova@imbp.ru

The paper analyses the morphological and functional features of cord blood cells (CBCs) in the co-culture with multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) from human adipose tissue under tissue-related oxygen. We have established that MMSCs effectively maintained viability of CBCs at different oxygen concentrations (1, 5 and 20 %). According to the data obtained, the oxygen concentration affected the number of colony-forming units (CFUs) formed by CBCs in selective medium. In particular, not co-cultured CBCs the 1 and 5 % O₂ than at 20 % O₂. After co-culture with MMSCs, the CFUs numbers were similar at 1 and 20 % O₂ and increased by 30 at 5 % O₂. Tissue related O₂ concentrations had an impact on the proportion of lineage-restricted CFCs among CBCs: the number of more committed progenitors — CFU-G and CFU-M, increased, and multi and bipotent — CFU-GEMM and CFU-GM, decreased at low oxygen concentrations. This effect was more pronounced after co-culture compared to that of initial CBCs. Thus, the presence of stromal cells and tissue-related oxygen jointly and severally influenced CBCs *in vitro*.

Key words: cord blood, hematopoietic stem cells, multipotent mesenchymal stromal cells, co-culture, oxygen.