

Ex vivo экспансия гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови (обзор литературы)

Т.В. Шаманская, Е.Ю. Осипова, С.А. Румянцев

ФГБУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева
Минздравоохранения России, Москва

Контакты: Татьяна Викторовна Шаманская totti111@list.ru

Пуповинная кровь (ПК) в настоящее время является привлекательным источником гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) для трансплантации в детской практике и у взрослых пациентов с различными злокачественными и незлокачественными заболеваниями. Однако ее применение в клинике ограничено низким количеством клеток в трансплантате, что коррелирует с отсроченным приживлением, удлинением времени до восстановления тромбоцитов и нейтрофилов, развитием инфекционных осложнений. Для решения этой проблемы было предпринято несколько попыток, одна из которых — получение достаточного количества гемопоэтических клеток-предшественников путем ex vivo экспансии. В данной статье проведен обзор литературы, посвященный особенностям экспансии ГСК ПК.

Ключевые слова: пуповинная кровь, ex vivo экспансия, цитокины

Umbilical cord bloods hematopoietic stem cells ex vivo expansion (the literature review)

T.V. Shamanskaya, E.Yu. Osipova, S.A. Roumiantsev

Dmitiry Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow

Umbilical cord blood (CB) is now an attractive source of hematopoietic stem cells (HSCs) for transplantation in pediatric and adult patients with various malignant and non-malignant diseases. However, its clinical application is limited by low cells numbers in graft, which correlates with delayed engraftment, an extension of time to platelets and neutrophils recovery and increasing risk of infectious complications. Several strategies have been suggested to overcome this limitation, one of which is obtaining a sufficient number of hematopoietic progenitor cells by ex vivo expansion. Literature review about CB HSCs expansion in given article is presented.

Key words: cord blood, ex vivo expansion, cytokines

Введение

С тех пор как S. Knudtson в 70-х годах XX века в своей работе описал наличие стволовых клеток в пуповинной крови (ПК), а в 80-х годах была выполнена первая трансплантация ПК от сиблинга пациенту с анемией Фанкони, ПК стала привлекать все большее внимание как источник гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) для проведения аутогенных и аллогенных трансплантаций [1]. Преимуществами ГСК, полученных из ПК, по сравнению с ГСК костного мозга (КМ) являются аутокринная продукция ряда гемопоэтических ростовых факторов, более длинные участки теломер, высокий пролиферативный потенциал [2, 3].

В настоящее время существует более 70 заболеваний, при которых используется трансплантация ГСК ПК. Это и заболевания крови, и иммунодефицитные состояния, болезни обмена и др. Однако ввиду небольшого количества клеток-предшественников в единице ПК ее применение для трансплантации было ограничено в основном использованием в детской практике (при расчете числа ядросодержащих клеток (ЯСК) не менее $2,5 \times 10^7$ /кг веса реципиента). Недостаточное количество ГСК в транспланта-

те приводит к удлинению времени до приживления нейтрофилов и тромбоцитов, ведет к увеличению количества тяжелых осложнений, летальности, повышению стоимости лечения в связи с более длительным пребыванием больного в стационаре необходимости назначения дополнительных препаратов (антибактериальных, противогрибковых, противовирусных и др. средств) и длительной инфузии компонентов крови. Поэтому применение ПК как источника ГСК для трансплантации у взрослых ограничено.

Для улучшения результатов трансплантации ПК (ускорения времени приживления нейтрофилов и тромбоцитов) используется несколько стратегий, таких как трансплантация 2 единиц ПК, ко-трансплантация CD34⁺- или CD133⁺-селектированной периферической крови от третьего лица и ГСК ПК [4, 5]. В качестве попытки преодоления низкого числа клеток-предшественников в ПК было предложено применение ex vivo экспансии клеток в жидкой среде с/без добавления сыворотки и коктейля из ростовых факторов. Поможет ли этот метод получить достаточное количество клеток для трансплантации, уменьшит ли это время до приживления, улучшит

ли результаты трансплантации — еще предстоит решить. В настоящее время используется несколько стратегий по экспансии и применению ГСК ПК. Это экспансия целой единицы ПК, либо экспансия ее части (1/2 или 1/3), которая пересаживается в тот же день, что и неманипулированная часть ПК или спустя какое-то время (обычно на день +14).

Важной является проблема дифференцировки ГСК, которая происходит при экспансии этих клеток.

Метод изоляции ГСК ПК для экспансии

Существует 2 стратегии выбора ГСК ПК для экспансии — это использование неселектированной моноклеарной (MNC) фракции ПК и проведение селекции клеток.

В экспериментальных исследованиях было показано, что при экспансии селектированной CD34⁺-фракции удается добиться лучших результатов экспансии ПК, чем при экспансии MNC-фракции (увеличение общего числа клеток в 113 раз при селекции, против увеличения в 1,4 раза при выборе моноклеарной фракции ПК) [6]. Однако в других работах по экспансии ГСК КМ было показано, что при проведении селекции часть ГСК, клеток-предшественников теряется [7].

Существует как минимум 2 маркера для селекции ГСК ПК — это CD34 и CD133.

CD34 — гликопротеин, который экспрессируется на эндотелиальных клетках и ГСК. CD133 — это гликопротеин, ранее называвшийся AC133. Он экспрессируется на незрелых гемопоэтических клетках и клетках-предшественниках.

В основе селекции CD34⁺- и CD133⁺-клеток лежит магнитно-активируемый клеточный сортинг (magnetic activated cell sorting — MACS), основанный на использовании антитела, связанного с микро-частицами, сделанными из желездекстранового комплекса, например, с использованием систем Miltenyi MACS system (Biotec, Inc., Auburn, CA, USA) или Baxter Isolex device (Baxter Deerfield, IL, USA) и др. При этом удается добиться чистоты селекции CD34⁺- или CD133⁺-клеток в пределах 90 % [8–10]. Ряд фенотипических и функциональных исследований показал, что CD133⁺-фракция ПК содержит большее количество ранних гемопоэтических клеток-предшественников, чем CD34⁺-фракция [11, 12]. И возможно, именно CD133⁺-клетки играют главную роль в лимитировании апоптоза, за счет межклеточного взаимодействия или выделения растворимых факторов [13–15].

Кроме того, для изоляции клеток-предшественников был предложен альтернативный путь, основанный не на фенотипе, а на функциональной активности клеток. Считают, что этот метод является более важным для уменьшения количества дифференцированных клеток в результате экспан-

сии. В его основе лежит селекция клеток на основе определения активности альдегиддегидрогеназы (aldehyde dehydrogenase — ALDH). Это метод легко воспроизводим, не токсичен для клеток человека и не изменяет их репопулирующую функцию. Дальнейшие исследования должны подтвердить выполнимость селекции клеток на основе определения активности альдегиддегидрогеназы для клинического применения [16].

При выборе метода изоляции ГСК для экспансии следует исходить из объема ПК, подвергающегося селекции, его клеточности, стоимости самой процедуры и общего числа клеток, которое необходимо получить для трансплантации.

Выбор питательной среды

Одной из важных основ для выполнения экспансии ГСК ПК является выбор питательных сред. Питательные среды должны быть максимально подобраны по своему составу, содержанию питательных субстанций, осмотической резистентности и pH для определенного типа клеток. Для экспансии ГСК возможно использование целого ряда питательных сред, таких как DMEM, Alpha-MEM, X-Vivo-10, QBSF-60, StemSpan SFEM, RPMI, CellGro и др.

IMDM является основной и наиболее часто используемой питательной средой. Это модифицированная версия питательной среды DMEM, которая дополнительно содержит аминокислоты, биотин, витамины (B₁₂) и селен [17].

Животная сыворотка традиционно включается в протоколы экспансии как источник факторов роста. Но при ее применении возможно развитие аллергических реакций, вирусной контаминации, а также необходимо учитывать ее вариабельность от партии к партии. Поэтому в протоколах для клинического применения стараются использовать бессывороточные питательные среды. Но такие среды слишком дороги и не всегда свободны от продуктов животного происхождения. Многие рекомбинантные цитокины и факторы роста получают из клеточных культур, выращенных на питательных средах с добавлением животной сыворотки. Кроме того, эти среды всегда подкреплены инсулином, трансферрином и альбумином, которые имеют рекомбинантное или аллогенное происхождение.

Относительно применения бессывороточных питательных сред существуют противоречивые данные. Ряд зарубежных и отечественных авторов показывают, что использование некоторых бессывороточных сред (QBSF-60 или StemSpan SFEM) позволяет получить несколько большее количество ранних предшественников (CD34⁺- и CD34⁺CD38⁺-клеток), чем при использовании стандартной среды IMDM с добавлением животной сыворотки [18]. Ученым из Республики Беларусь удалось добиться увеличения CD34⁺-клеток ПК более чем в 200 раз при культивировании

в бессывороточной питательной среде StemSpan при использовании цитокинов IL-3, IL-6, CSF, Flt-3. Добавление к культурам мезенхимальных стволовых клеток (МСК), полученных из КМ, способствовало дополнительному увеличению CD34⁺-клеток более чем в 700 раз [19].

В качестве альтернативы животной сыворотке возможно использование аутологичной сыворотки ПК. Допустимо замораживание плазмы уже при первичной заготовке единицы ПК. Однако в ряде исследований показано, что ее добавление к питательным средам приводит к значительному снижению ранних предшественников CD34⁺- и CD34⁺CD38-клеток. Это происходит в результате того, что человеческая плазма содержит факторы, способствующие созреванию клеток [20]. Кроме того, заготовка и хранение аутологичной плазмы ПК приведет к дополнительным финансовым затратам для Банков ПК.

На клеточный выход в результате экспансии оказывает свое влияние и плотность пассажа. Особо важное значение это имеет для ПК ввиду потенциального ограничения клеток для экспансии и высокой вариабельности от донора к донору. Оптимальной является плотность пассажа 1×10^4 – 1×10^6 клеток/мл. Следует учитывать, что если среда содержит сыворотку, то плотность клеток при пассаже может быть меньше. И это может быть связано с эндогенной продукцией клетками ростовых факторов [21]. Если же используется бессывороточная среда, то большее количество клеток используется для пассажа. Особенно это имеет значение при культивировании в перфузионных культуральных системах.

Цитокины

С начала 1980-х годов XX века исследователи стали использовать разные комбинации цитокинов и ростовых факторов для экспансии ГСК, стремясь выбрать не только более эффективную комбинацию, но и наиболее пригодную для клинического применения. На настоящий момент идентифицировано и выделено более 30 факторов, которые влияют на пролиферацию и дифференцировку ГСК [22]. Среди них эритропоэтин (erythropoietin – EPO), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (granulocyte colony-stimulating factor – G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor – GM-CSF), фактор стволовых клеток (stem cell factor – SCF), тромбопоэтин (thrombopoietin – TPO), Flt-3 лиганд (Flt-3/Flt-2 ligand – FL), фактор роста фибробластов (fibroblast growth factor – Fgf), интерлейкины-1, 3, 6, 11 (interleukin – IL-1, IL-3, IL-6/sIL-6R, IL-11) [23–26].

Наиболее важным фактором, влияющим на выживаемость клеток-предшественников даже при отсутствии их деления, является SCF [27]. SCF – лиганд для тирозинкиназных рецепторов *c-kit*, которые

экспрессируются на ранних и зрелых гемопоэтических клетках-предшественниках. Использование для экспансии только одного SCF не дает существенного увеличения количества клеток [25]. В сочетании же с другими ростовыми факторами он влияет на пролиферацию и дифференцировку клеток миелоидной, лимфоидной, эритроидной и мегакариоцитарной линий и потенцирует действие других ростовых факторов [28].

ТРО – самый активный фактор в отношении стимуляции мультипотентных стволовых клеток и клеток тромбоцитарного ряда. Он является активатором пролиферации и дифференцировки незрелых мегакариоцитов [29].

Считается, что ТРО и FL предотвращают деградацию теломера, а SCF и IL-6 увеличивают пролиферативный потенциал ГСК. FL в комбинации с другими ростовыми факторами значительно усиливает клоногенную активность клеток-предшественников [30–32].

Описано влияние FL на адгезивность ГСК к микроокружению КМ за счет изменения степени экспрессии и функциональных свойств β -1-интегринов. Это оказывает важное влияние на хоуминг ГСК при трансплантации [33].

В комбинации с IL-3 и IL-6 ТРО оказывает потенцирующее действие на колониемоформирующую активность мегакариоцитов (colony-forming unit megakaryocytic – FU-Meg) [34]. Однако он влияет и на клетки миелоидной и эритроидной линий дифференцировки [35].

IL-6, взаимодействуя с рецептором (IL-6-R), приводит к гомодимеризации молекулы gp130, которая в свою очередь запускает внутриклеточные сигнальные пути и играет важную роль в гемопоэзе. Однако как и другие ростовые факторы, он не оказывает одиночного влияния на экспансию ГСК, а проявляет свое действие совместно с другими цитокинами. Уже только добавление в среду с IL-6 SCF приводит к усилению пролиферации человеческих гемопоэтических клеток-предшественников *in vitro* [35].

Различные комбинации ростовых факторов оказывают разное действие на степень пролиферации и апоптоза клеток-предшественников. Так, использование комбинации ТРО, FL дает увеличение числа CD34⁺Thy-1⁺-клеток периферической крови при наличии наиболее низкого числа апоптотических клеток, чем при использовании комбинации IL-3, IL-6 и лейкоз-ингибирующего фактора (LIF), при которой отмечено даже снижение количества экспандируемых клеток [36].

Различные доклинические и клинические протоколы могут включать в себя и различные комбинации ростовых факторов: SCF, IL-3, IL-6 и G-CSF; SCF, ТРО и G-CSF; FL, SCF, IL-3, IL-6 и G-CSF.

При подборе наиболее оптимальной комбинации ростовых факторов в доклинических исследова-

ниях было показано, что наибольшее число CD34⁺-клеток при экспансии может быть получено при использовании такой группы цитокинов, как TPO + SCF + FL + IL-6. Однако эти результаты зависели и от выбора питательной среды. Наибольшее количество экспансированных клеток было получено на бессывороточных питательных средах с данной комбинацией цитокинов, по сравнению со стандартной питательной средой и добавлением животной сыворотки и этим же коктейлем цитокинов [18].

Многофакторные исследования показали всю важность влияния различных комбинаций ростовых факторов и выбора их концентрации на результаты экспансии. Однако вопрос об оптимальном соотношении ростовых факторов все еще остается открытым.

В одной из наиболее ранних клинических работ, выполненной в 1992 г., была показана возможность экспансии достаточного количества клеток КМ, необходимого для трансплантации, и безопасность их применения. Часть клеток КМ инкубировалась в среде RPMI с человеческой сывороткой и добавлением GM-CSF, IL-3. У больных, получивших неманипулированную и дополнительно экспансированную часть КМ, отмечалось более быстрое восстановление числа тромбоцитов [37].

В другой работе в качестве источника клеток-предшественников брали периферическую кровь. Экспансию проводили в среде RPMI с добавлением аутологичной сыворотки и ростовых факторов SCF, IL-1 β , IL-3, IL-6 и EPO. В ходе исследования было получено увеличение ЯСК в среднем в 62 раза, медиана составила $11,8 \times 10^6/\text{кг}$ веса пациента. Была показана безопасность данного метода, который для проведения экспансии требует маленького объема периферической крови, что снижает риск загрязнения трансплантата опухолевыми клетками и необходимость дополнительного проведения лейкофереза у больных [38].

Аналогичное исследование с таким же набором ростовых факторов для экспансии показало возможность расширения *ex vivo* клеток-предшественников периферической крови после криоконсервации. При этом, количество клеток в среднем увеличилось в 21 раз. Это исследование показало, что CD34⁺-клетки могут быть успешно культивированы из криозамороженных материалов и в дальнейшем безопасны для применения у пациентов [39].

S.F. Williams et al. были предприняты попытки экспансии клеток периферической крови с использованием бессывороточной среды X-VIVO с человеческим сывороточным альбумином и PIXY321 (GM-CSF/IL-3 химерный белок). При этом среднее число клеток увеличилось в 26 раз. И хотя инфузия экспансированных клеток хорошо переносилась, клинического эффекта получено не было [40].

В работе R.A. Briddell et al. была показана возможность экспансии клеток, выделенных из другого

источника, — ПК: культивирование их в различных питательных средах с добавлением цитокинов (SCF, G-CSF, TPO). При этом наилучших результатов удалось добиться при культивировании селектированной CD34⁺-фракции ПК (увеличение общего числа клеток в 113 раз, против 1,4 раза при культивировании неселектированной фракции ПК) [6]. Этими и другими исследователями показана осуществимость применения данного продукта в клинической практике, где не было отмечено каких-либо токсических реакций [41–43]. Однако никакого значительного влияния на ускорение восстановления нейтрофилов и тромбоцитов у реципиентов получено не было.

Полная оценка влияния различных комбинаций ростовых факторов на проведение экспансии ГСК затруднена из-за ограниченного выпуска разрешенных для клинического применения препаратов.

В настоящее время клинических результатов по применению в трансплантации экспансированной части ПК недостаточно. Основные исследования представлены в таблице. Эти исследования достаточно разнообразны, и они включают как культивирование в статических условиях, так и с применением перфузионных систем, с добавлением стромальных элементов к ростовым факторам и т. д. Большинство протоколов для экспансии включали в себя SCF и TPO в комбинации с другими ростовыми факторами. Эти исследования показали безопасность данного метода. Но в большинстве случаев не было отмечено значимого влияния на приживление трансплантата. Необходим дальнейший набор пациентов для более полной оценки влияния экспансии ГСК на результаты проведения трансплантации ПК.

Кроме стандартного набора цитокинов для экспансии в лабораторных исследованиях была показана роль различных ионов (железа, кальция, магния, цинка) на рост, пролиферацию и дифференцировку клеток. Учитывая значительные клинические изменения, возникающие при дефиците ионов меди в организме человека (анемия, нейтропения, тромбоцитопения), было изучено их влияние на изменение основных клеточных функций.

Так, например, было показано, что хелатор меди (copper chelator tetraethylenepentamine — ТЕРА) оказывает ингибирующее влияние на процессы дифференцировки клеток-предшественников, а также увеличивает процессы самовозобновления клеток, улучшая приживление трансплантата у иммунодефицитных мышей. Эти процессы происходят в результате изменения клеточных концентраций меди [44, 45].

При проведении предклинических исследований был разработан протокол экспансии клеток-предшественников ПК с использованием основных цитокинов (TPO, IL-6, SCF и FL) и хелаторного комплекса меди — ТЕРА, который привел к увеличению CD34⁺-клеток в 86 раз. В дальнейшем протокол экспансии, основанный на полученных данных, был

Клинические исследования по применению *ex vivo* экспансии ПК

	Число пациентов, включенных в исследование	Среда для культивирования / селекция клеток	Сыворотка / ростовые факторы	Результаты исследования	Кратность экспансии ЯСК	Кратность экспансии CD34 ⁺
Перфузионная система Aastrom/Replicell system (Jaroscak, 2003)	28	Iscove modified Dulbecco medium	10 % бычья сыворотка, PIXY321 – 5 ng/mL; EPO – 0.1 U/mL; flt-3 ligand – 25 ng/mL	Доказанная безопасность и выполнимость; не улучшало приживления трансплантата	в 2,4 раза	0,5
Жидкая суспензионная система (Shpall, 2002)	37	CD34 ⁺ -селекция	SCF – 100 ng/mL; G-CSF – 100 ng/mL; MGDF – 100 ng/mL	Доказанная безопасность и выполнимость; не улучшало приживления трансплантата	56	4
University of Texas MD Anderson Cancer Center (de Lima and Shpall, 2008)	10	Среда aMEM; CD133 ⁺ -селекция	10 % FBS SCF, FL, IL-6, TPO и ТЕРА	Доказанная безопасность и выполнимость; не улучшало приживления трансплантата	219	6
Жидкая суспензионная система (Delaney et al., 2010)	10	CD34 ⁺ -селекция; бессывороточная среда	Notch ligand d-1, SCF, FL, IL-6, TPO, IL-3	Доказанная безопасность и выполнимость; время до восстановления нейтрофилов – 16 дней	562	164
Экспансия со стромальными клетками (de Lima and Shpall, 2009)	6		SCF, TPO, G-CSF	Доказанная безопасность и выполнимость; время до восстановления нейтрофилов – 14,5 дней	12	12

рекомендован для проведения клинических испытаний при проведении трансплантации ПК у больных со злокачественными онкогематологическими заболеваниями [46].

Были проведены клинические испытания I/II фазы препарата StemEx, содержащего экспансированную часть единицы ПК, культивированную в течение 21 дня в среде с содержанием коктейля цитокинов (SCF, FL, IL-6, TPO – 50 нг/мл) и хелатора меди ТЕРА. Число ЯСК в среднем увеличилось в 219 (2–620) раз и CD 34⁺-клеток в среднем в 6 раз (по содержанию CD34⁺-клеток во всей единице ПК). Экспансированные клетки были пересажены без каких-либо трансфузионных осложнений. Время до приживления нейтрофилов составило 30 дней, тромбоцитов – 48 дней, что сопоставимо с данными при использовании неманипулированной ПК. Также не было отмечено увеличения количества случаев острой реакции «трансплантат против хозяина» [47]. В настоящее время проводится набор больных для проведения III фазы клинических испытаний с включением нескольких центров.

В Университете Техаса, США (MD Anderson Cancer Center) также было показано отсутствие ток-

сичности при проведении больным с продвинутыми стадиями гемобластозов трансплантации экспансированной части ПК (среда aMEM с 10 % FBS и SCF, FL, IL-6, TPO с добавлением ТЕРА), экспансия выполнена на части ПК.

Таким образом, была показана клиническая доступность и безопасность препарата для экспансии ГСК на основе хелаторного комплекса меди [48].

В качестве еще одной добавки для проведения экспансии ГСК ПК китайскими учеными из Chinese University (Гонконг) было предложено использование лектина, связывающего манозу (mannose-binding lectin – NTL), полученного из китайского нарцисса *Narcissus tazetta* var. *Chinensis*, для пролонгированного поддержания и экспансии CD34⁺-клеток ПК [49].

Лектины (от лат. legere – собирать) – это класс углеводов-специфических белков. Они выполняют множество функций в организме, например, участвуют в регуляции клеточной адгезии, синтеза гликопротеинов и др. Лектины использовались в исследованиях агглютинации эритроцитов, для диагностики групп крови, и на субпопуляциях лимфоцитов [50].

ОТ РЕДАКЦИИ / FROM EDITION



Удивительные открытия в области молекулярной генетики, которые казались столь далекими от проблем практической медицины, в последнее 10-летие привнесли совершенно новое понимание сути многих заболеваний, недавно считавшихся фатальными, и что особенно важно – новые возможности их лечения. Стало очевидно, что на этом пути откроются удивительные перспективы и ждут неожиданные открытия. Знание конкретных событий, которые лежат в основе биологических процессов и глубинных событий патогенеза ряда заболеваний, уже привело к созданию принципов целенаправленной (таргетной) терапии, суть которой состоит в поражении конкретных целей, являющихся ключевыми в развитии патологического процесса. Первой демонстрацией реальности такого, почти фантастического события стали открытия молекулярно-генетической сути патогенеза хронического миелоидного лейкоза и его лечения ингибиторами тирозинкиназ. Последовал шквал создания препаратов с разными механизмами действия, но общей идеей – максимально точного поражения цели, основанного на знании нарушений в жизнедеятельности клеток и на путях их регуляции на молекулярно-генетическом уровне. Есть основания полагать, что именно в этом направлении нас ожидают дальнейшие успехи развития медицинской науки и практики. К сожалению, эта важная область знаний не заняла пока достойного места в системе медицинского образования.

Мы были рады уникальной возможности представить цикл лекций Д.А. Домнинского по основам молекулярно-генетических механизмов лейкозогенеза. Завершая его, редакция надеется, что читатели получили возможность убедиться в необходимости научиться понимать сложные процессы развития и течения тех болезней, которые мы не всегда успешно пытаемся предотвратить и лечить.

Редакция планирует продолжить публиковать материалы по этой тематике. Ждем ваших писем и отзывов и впредь всегда будем рады предоставить страницы журнала «Онкогематология» для ваших оригинальных статей и обзоров.

Однако до конца их механизм действия на гемопоэтические клетки-предшественники не изучен.

Строма

В последнее время особое внимание уделяется совместному культивированию ГСК со стромальными элементами. Эффект влияния стромальных клеток сводится, во-первых, к прямому межклеточному взаимодействию и передаче сигнальной информации, а во-вторых, к выделению регулирующих белков: цитокинов, хемокинов (таких как GM-CSF, IL-3, IL-6, SCF, FL, TPO) [51, 52]. Стромальные клетки оказывают влияние на самовозобновление, пролиферацию, а также тормозят созревание и дифференцировку ГСК [22, 53–55].

Доклинические исследования продемонстрировали способность МСК поддерживать экспансию CD34⁺-клеток при совместном культивировании с ГСК. Кроме того, ряд исследователей показали, что в качестве альтернативного источника МСК можно использовать плаценту, а совместное культивирование CD34⁺-фракции ПК и МСК, полученных из плаценты, приводит к увеличению CD34⁺-клеток в 14,89 раза [47, 56–58]. Одним из преимуществ использования совместного культивирования ПК и МСК является возможный отказ от селекции CD34⁺, при которой теряется определенный процент клеток [59]. Кроме того, неманипулированную ПК можно культивировать только в перфузионных культуральных системах. А культивирование нефракционированной ПК или выделение только моноклеарной фракции ПК в статических средах не приводило к желаемым результатам экспансии [6].

I. McNiece в своем исследовании показал, что совместное культивирование моноклеарной фракции ПК и МСК в среде с добавлением рекомбинантных ростовых факторов приводит к 10-20-кратному увеличению ЯСК, в то время как без добавления МСК количество клеток после 13 дней культивирования было таким же, как в день 0. Он выдвигает гипотезу, что, возможно, МСК защищают клетки-предшественники от действия ингибирующих факторов или сами выделяют ряд факторов, стимулирующих рост клеток-предшественников [60].

Кроме того, было показано, что МСК, полученные на ранних пассажах, способствуют не только пролиферации ГСК, но и сохранению ими примитивного иммунофенотипа CD34⁺ CD38⁻ или CD133⁺ CD38⁻, тем самым способствуя задержке дифференцировки ГСК к более высокому числу клеточных делений [61].

Однако остается вопрос, смогут ли поддержать экспансию ГСК только стромальные клетки при культивировании в среде, не содержащей цитокины [52].

Кроме того, при совместном культивировании с МСК возникает вопрос о защите конечного про-

дукта экспансии от контаминации инфекционными агентами, и не приведет ли совместное культивирование к росту числа случаев иммунологической реакции отторжения.

Длительность экспансии

По данным разных авторов длительность культивирования ГСК ПК в среднем составляет от 7-10 до 14 дней. Поскольку клетки ПК являются более интенсивно пролиферирующими, чем клетки КМ, возможно, для их экспансии потребуется меньше времени. И в то же время, так как клетки ПК более примитивны, то для достижения ими оптимальной стадии роста может потребоваться больше времени.

Укорочение времени экспансии может иметь преимущества при планировании сроков проведения химиотерапии и трансплантации.

В ходе проведения работ по экспансии возможно использование одноступенчатой системы, например, в течение 10 дней использование определенной питательной среды с добавлением SCF, TPO и G-CSF [41]. Применение данной комбинации ростовых факторов показало увеличение ЯСК в 56 раз и CD34⁺-клеток в 4 раза.

I. McNice предложил использовать двухступенчатый протокол, который привел к увеличению ЯСК более чем в 400 раз, а CD34⁺-клеток — в 29 раз. При использовании двухступенчатого протокола первые 7 дней клетки культивировались в тефлоновых мешках объемом 100 мл с применением 50 мл среды, SCF, G-CSF и MGDF (100 ng/mL), затем клетки пересаживались в мешки большего объема (на 1000 мл), количество среды увеличивалось до 1 литра с добавлением тех же ростовых факторов [62].

В лабораторных исследованиях культивирование ГСК проводится статическим способом, используя вентилируемые пластиковые флаконы или мешки. Для промышленного применения необходимо в результате экспансии получить большое число клеток, достаточное для выполнения трансплантации. Для этого было предложено использовать биореакторы.

Существует несколько видов биореакторов.

Во-первых, перфузионные биореакторы. В ходе I фазы клинических испытаний по трансплантации ГСК ПК, полученных в результате экспансии в перфузионной системе AastromReplicell System с использованием стандартной питательной среды, 10 % животной сывороткой и набора цитокинов PIXY321, EPO, FL, было получено увеличение общего числа ЯСК в 2,4 раза. При инфузии реципиентам побочных реакций отмечено не было [43]. Подобные результаты были показаны и в других работах [63].

Во-вторых, биореактор с фиксированной твердой фазой (fixed bed bioreactor). Применение этого биореактора было основано на положительном влиянии стромальных клеток на результаты экспансии ГСК. При этом стромальные клетки захватываются

в фиксированную подложку, через которую циркулируют питательная среда и ГСК [64].

В-третьих, перемешивающий биореактор (stirred bioreactor). При сравнительном культивировании в питательной среде с низкими дозами цитокинов лучшие результаты экспансии были получены при использовании биореактора, чем при культивировании во флаконах [65].

За последнее время было проведено много экспериментальных работ по экспансии ГСК, которые привели к клиническим испытаниям трансплантации *ex vivo*-расширенных клеток у пациентов. Однако это требует разработки доступных и стандартизированных протоколов экспансии ГСК, наиболее пригодных для клинического применения.

Дальнейший прогресс в области экспансии ГСК будет тесно связан с пониманием клеточных и молекулярных механизмов самообновления, пролиферации и дифференцировки этих клеток. Сюда относятся и регуляция факторов транскрипции семейства HOX, Myb, PU.1, GATA, изучение механизмов регуляции клеточного цикла и теломеразной активности, модификация хроматина.

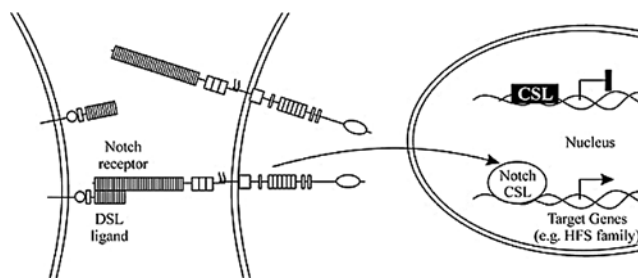
HOX-гены кодируют большое семейство транскрипционных факторов. У млекопитающих есть 4 главных семейства HOX-факторов (A, B, C и D). HOXB4 является одним из главных регуляторов самовозобновления ГСК у млекопитающих. У HOXB4-дефицитных мышей снижена способность к пролиферации ГСК, но с сохранением их дифференцировки и линейности [66, 67]. Эктопией экспрессии HOXB4 удастся добиться значительной экспансии ГСК и мышей, и человека [68].

В исследовательских работах было показано регулирующее влияние ядерного фактора NF- κ B на индукцию гена HOXB4 в гемопоэтических клетках [69].

Применение трансдукции TAT-NF- κ B в ГСК ПК оказывало влияние на результаты экспансии через различные проводящие пути (в том числе через Notch-1). Однако эффекты этого влияния еще необходимо обсудить на мышинных моделях и в I фазе клинических испытаний.

Знания в области сигнальных путей, которые отвечают за самоподдержание и дифференцировку, являются важной проблемой в понимании биологии стволовой клетки. В последние годы были открыты внутриклеточные сигнальные пути, отвечающие за регуляцию самоподдержания ГСК, такие как Notch (см. рисунок), Wnt/b-catenin, рецептор тирозинкиназы Tie2, морфогенетический протеин кости (bone morphogenetic proteins – BMP) в комбинации с транскрипционным фактором Bmi-1 [70, 71].

В исследовании A. Duncan et al. было показано, что передача сигналов Notch является активной в гемопоэтических клетках и особенно важной на самых ранних стадиях гемопоэтического развития. Ингибирование этого сигнального пути приводит



Схематическое изображение сигнального пути Notch (Mumt, Kopan, 2000)

к дифференцировке ГСК *in vitro* и истощению *in vivo* [72]. Сигналы Notch играют важную роль в клеточной дифференцировке, апоптозе, адгезии, пролиферации, эпителиально-мезенхимальной трансформации. У млекопитающих выделено 5 Notch-лиганд: Jagged-1/2 и Delta-1/3/4. Сигналы, поступающие в межклеточное пространство в виде секретируемых молекул лигандов Delta, воспринимаются близлежащими окружающими клетками. На клеточной поверхности воспринимающих сигнал и экспрессирующих рецептор клеток происходит взаимодействие внеклеточного домена лиганда Delta и трансмембранного рецепторного белка Notch. Белок рецептора состоит из 3 доменов: внеклеточного, связывающегося с лигандом и подавляющего активность в отсутствие лиганда, внутримембранного и внутриклеточного, способного передавать сигнал к генам-мишеням. В результате этого взаимодействия происходит расщепление и высвобождение внутриклеточного домена Notch-рецептора, связанного с мембранно-ассоциированным протеазным комплексом. Внутриклеточный домен Notch транспортируется в ядро, и собранный ядерный комплекс регулирует транскрипцию нескольких Notch-эффекторных генов [73].

Еще в 1998 г. B. Varnum-Finney показала, что Notch-лиганд Jagged-1 при проведении экспансии приводит к 2- и 3-кратному увеличению примитивных клеток-предшественников в культуре [74]. Это было подтверждено и в других исследованиях. Jagged-1 имел небольшое влияние на пролиферацию зрелых клеток-предшественников, однако на моделях ксенотрансплантатов у иммунодефицитных мышей было показано, что он способствует поддержанию и экспансии примитивных клеток-предшественников *in vivo* с сохранением их способности к мультилинейной реконституции без потери клеток-предшественников [75].

На результаты экспансии оказывает влияние и концентрация Notch-лиганд на поверхности клеток. Низкие концентрации Delta-1 приводили к увеличению числа CD34⁺-клеток пуповинной крови, в отличие от этого высокие концентрации, наоборот, приводили к апоптозу [76]. Кроме того, концентрация оказывает влияние на пути дифференцировки

клеток. При различной концентрации дифференцировка может идти либо по лимфоидному пути, либо по миелоидному. В зависимости от формы лиганда, он может оказывать и отличное влияние. Растворимая форма Delta-1 способна действовать как активатор только лишь в том случае, если молекула иммобилизована на клеточной мембране или культуральном пластике. Кроме того, иммобилизованные формы Delta-1 показали свое преимущество по сравнению с растворимыми или трансмембранными формами [77].

Недавно С. Delaney et al. сообщили о применении для экспансии ПК коктейля из цитокинов и ростовых факторов (IL-3, IL-6, TPO, FL, SCF) с добавлением Delta-like-1, что приводило к 160-кратному увеличению CD34⁺-клеток. Была проведена I фаза клинических испытаний на 10 пациентах с двойной трансплантацией ПК, показавшая более быстрое приживание и восстановление нейтрофилов у реципиентов, получивших экспансированную часть ПК [78].

Wnt-сигнальный путь является для клеток сигналом к более медленному разрушению их белков, более длительному их сохранению, так как они могут быть необходимы для регулирования функции клеток, например таких, как самоподдержание. Начинается процесс с присоединения лиганда Wnt к рецепторам клеточной поверхности генов семейства frizzled/LRP. Это ведет к накоплению β -catenin в цитоплазме и его транслокации в ядро. Результатом таких реакций становится инициация транскрипции в ядре и включение целого ряда факторов, определяющих процессы дифференцировки и самоподдержания. Как средство для воздействия на Wnt-сигнальный путь *in vivo* был использован ингибитор гликоген синтазы киназы-3 (glycogen synthase kinase-3 – GSK-3) 6-Bromoindirubin-3'-oxime (BIO), который улучшал нейтрофильное и мегакариоцитарное восстановление у мышей после трансплантации, приводя к усилению поддержания длительной репопуляции [79].

Состояние покоя является необходимым свойством для поддержания ГСК. Оно может обеспечиваться при участии сигнального пути тирозинкиназы Tie2/лиганд ангиопоэтин-1 (Ang-1). ГСК с длительным самоподдержанием, которые экспрессируют рецептор тирозинкиназы Tie2, находятся в состоянии покоя и прилипают к остеобластам КМ. Ang-1, экспрессируемый клетками-остеобластами, активирует Tie2-сигнальный путь, и это ограничивает ГСК в состоянии покоя и защищает от апоптоза [80].

Усовершенствуя протоколы экспансии ГСК ПК, в настоящее время все-таки не удастся получить оптимального количества клеток, необходимых для трансплантации с сохранением их стволовости. Однако немаловажную роль в приживлении трансплантата играет хоуминг ГСК. В настоящее время изучены механизмы, с помощью которых можно оказывать влияние на хоуминг ГСК. Хорошо изученным фактором хоуминга стволовых клеток и клеток-предшественников КМ является белок SDF-1/CXCL12, относящийся к хемокинам. SDF-1 оказывает влияние на клетки, ингибируя апоптоз, стимулируя пролиферацию, усиливая адгезию и подвижность клеток, а также влияет на процессы хемотаксиса и миграции. Ряд исследований посвящен влиянию малых белковых молекул (С3а, гиалуроновая кислота, фибронектин, фибриноген) на чувствительность SDF-1/CXCL12 и опосредованно на хоуминг ГСК ПК при трансплантации. Предварительная обработка ПК малыми молекулами перед трансплантацией поможет улучшить приживание [81].

Клиническое использование культивированных гемопоэтических клеток, начатое с 1990-х годов, показало техническую возможность выполнения этого метода для получения достаточно большого количества клеток, необходимых для трансплантации, безопасность применения полученного продукта при введении больным и некоторую тенденцию к ускорению гемопоэтического восстановления после их введения. Однако учитывая, что клетки-предшественники ПК, по всей видимости, отличаются по их способности к экспансии по сравнению с другими источниками стволовых клеток (периферическая кровь, КМ), клинический интерес будет сохраняться именно в отношении экспансии клеток ПК и применения их для дальнейшей трансплантации, особенно во взрослой практике.

Кроме того, используя различные культуральные технологии возможно получить такие клеточные субпопуляции ПК, как Т-клетки и НК-клетки и использовать их в дальнейшем для иммунотерапии [82, 83].

В последнее время немало внимания уделяется экспансии и генной инженерии, экспансии и дифференцировке ГСК в зрелые клетки, например, эритроциты. В результате ступенчатого протокола экспансии удалось получить зрелые эритроциты, которые могут быть использованы в качестве аутогемотрансфузии при некоторых формах анемии (например серповидно-клеточной) и при хронической кровопотере [84].

Л и т е р а т у р а

1. Knudtson S. *In vitro* growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood* 1974;43(3):357–61.
2. Mayani H., Lansdorp P.M. Thy-1 expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood. *Blood* 1994;83(9):2410–7.
3. Vaziri H., Dragowska W., Allsopp R.C. et al. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: Loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(21):9857–60.
4. Barker J.N., Weisdorf D., Wagner J. Creation of a double chimera after the transplantation of umbilical-cord blood from two partially matched unrelated donors. *N Engl J Med* 2001;344:1871.
5. Magro E., Regidor C., Cabrera R. et al. Early hematopoietic recovery after single unit unrelated cord blood transplantation in adults supported by co-infusion of mobilized stem cells from a third party donor. *Haematologica* 2006;91:640–8.
6. Briddell R.A., Kern B.P., Zilm K.L. et al. Purification of CD34⁺ cells is essential for optimal *ex vivo* expansion of umbilical cord blood cells. *J Hematother* 1997;6(2):145–50.
7. Koller M., Manichel I., Newsom B. et al. Bioreactor expansion of human bone marrow: comparison of unprocessed, density-separated, and CD34-enriched cells. *J Hematother* 1995;4(3):159–69.
8. Madkaikar M., Ghosh K., Gupta M. et al. *Ex vivo* expansion of umbilical cord blood stem cells using different combinations of cytokines and stromal cells. *Acta Haematol* 2007;118(3):153–9.
9. McNiece I. Delivering cellular therapies: Lessons learned from *ex vivo* culture and clinical applications of hematopoietic cells. *Semin Cell Dev Biol* 2007;18(6):839–45.
10. Purdy M.H., Hogan C.J., Hani L. et al. Large volume *ex vivo* expansion of CD34-positive hematopoietic progenitor cells for transplantation. *J Hematother* 1995;4(6):515–25.
11. De Wynter E.A., Buck D., Hart C. et al. CD34⁺AC133⁺ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells* 1998;16(6):387–96.
12. Forraz N., Pettengell R., Deglesne P.A., McGuckin C.P. AC133⁺ umbilical cord blood progenitors demonstrate rapid self-renewal and low apoptosis. *Br J Haematol* 2002;119(2):516–24.
13. McNiece I., Briddell R. *Ex vivo* expansion of haemopoietic progenitor cells and mature cells. *Exp Hematol* 2001;29(1):3–11.
14. Gallacher L., Murdoch B., Wu D.M. et al. Isolation and characterization of human CD34(–)Lin(–) and CD34(+)Lin(–) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood* 2000;95(9):2813–20.
15. Hofmeister C.C., Zhang J., Knight K.L. et al. *Ex vivo* expansion of umbilical cord blood stem cells for transplantation: Growing knowledge from the hematopoietic niche. *Bone Marrow Transplant* 2007;39(1):11–23.
16. Hess D.A., Meyeroose T.E., Wirthlin L. et al. Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood* 2004;104(6):1648–55.
17. Koestenbauer S., Zisch A., Dohr G., Zech N.H. Protocols for hematopoietic stem cell expansion from umbilical cord blood. *Cell Transplant* 2009;18(10):1059–68.
18. Lam A.C., Li K., Zhang X. B. et al. Preclinical *ex vivo* expansion of cord blood hematopoietic stem and progenitor cells: duration of culture; the media, serum supplements, and growth factors used; and engraftment in NOD/SCID mice. *Transfusion* 2001;41(12):1567–76.
19. Потанин М.П., Петевка Н.В., Гончарова Н.В. и др. Пуповинная кровь как источник гемопоэтических и негемопоэтических клеток человека. Материалы международного симпозиума «Актуальные вопросы донорского и персонального хранения стволовых клеток». Клет трансплантол и ткан инж 2009;IV(3):14.
20. Bertolini F., Lazzari L., Lauri E. et al. Cord blood plasmamediated *ex vivo* expansion of hematopoietic progenitor cells. *Bone Marrow Transplant* 1994;14:347–53.
21. Koller M.R., Manichel I., Maher R.J. et al. Clinical-scale human umbilical cord blood cell expansion in a novel automated perfusion culture system. *Bone Marrow Transplant* 1998;21(7):653–63.
22. Hai-Jiang W., Xin-Na D., Hui-Jun D. Expansion of hematopoietic stem/progenitor cells. *Am J Hematol* 2008;83(12):922–6.
23. Brandt J., Briddell R.A., Srou E.F. et al. Role of c-kit ligand in the expansion of human hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1992;79(3):634–41.
24. Srou E.F., Brandt J.E., Briddell R.A. et al. Long-term generation and expansion of human primitive hematopoietic progenitor cells *in vitro*. *Blood* 1993;81(3):661–9.
25. Brugger W., Mocklin W., Heimfeld S. et al. *Ex vivo* expansion of enriched peripheral blood CD34-progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-6, IL-3, interferon-gamma, and erythropoietin. *Blood* 1993;81(10):2579–84.
26. Shapiro F., Yao T.J., Raptis G. et al. Optimization of conditions for *ex vivo* expansion of CD34-cells from patients with stage IV breast cancer. *Blood* 1994;84(10):3567–74.
27. Keller J.R., Ortiz M., Ruscetti F.W. Steel factor (c-kit ligand) promotes the survival of hematopoietic stem/progenitor cells in the absence of cell division. *Blood* 1995;86:1757–64.
28. McNiece I., Briddell R. Stem cell factor. *J Leukoc Biol* 1995;58(1):14–22.
29. Sitnicka E., Lin N., Priestley G.V. et al. The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells. *Blood* 1996;87:4998–5005.
30. Shah A.J., Smogorzewska E.M., Hannum C., Crooks G.M. Flt3 ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow CD34⁺ CD38– cells and maintains progenitor cells *in vitro*. *Blood* 1996;87:3563–70.
31. Yonemura Y., Ku H., Lyman S.D., Ogawa M. *In vitro* expansion of hematopoietic progenitors and maintenance of stem cells: comparison between FLT3/FLK-2 ligand and KIT ligand. *Blood* 1997;89:1915–21.
32. Rusten L.S., Lyman S.D., Veiby O.P., Jacobsen S.E. The FLT3 ligand is a direct and potent stimulator of the growth of primitive and committed human CD34⁺ bone marrow progenitor cells *in vitro*. *Blood* 1996;87:1317–25.
33. Solanilla A., Grosset C., Ducheux P. et al. FLT3-ligand induces adhesion of haematopoietic progenitor cells via a very late antigen (VLA)–4- and VLA–5-dependent mechanism. *J Haematol* 2003;120(5):782–6.
34. Broudy V.C., Lin N.L., Kaushansky K. Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy *in vitro*. *Blood* 1995;85:1719–26.
35. Sui X., Tsuji K., Tanaka R., Tajima S. et al. gp130 and c-Kit signalings synergize for *ex vivo* expansion of human primitive hemopoietic progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:2859–63.
36. Murray L.J., Young J.C., Osborne L.J. et al. Thrombopoietin, flt3, and kit ligands together suppress apoptosis of human mobilized CD34⁺ cells and recruit primitive CD34⁺ Thy-1+ cells into rapid division. *Exp Hematol* 1999;27(6):1019–28.
37. Naparstek E., Hardan Y., Ben-Shahar M. et al. Enhanced marrow recovery by short preincubation of marrow allografts with human recombinant interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1992;80(7):1673–8.
38. Brugger W., Heimfeld S., Беренсон R.J. et al. Reconstitution of hematopoiesis after high-dose chemotherapy by autologous progenitor cells generated *ex vivo*. *N Engl J Med* 1995;333(5):283–7.
39. Alcorn M.J., Holyoake T.L., Richmond L. et al. CD34-positiv cells isolated from cryopreserved peripheral-blood progenitor cells can be expanded *ex vivo* and used for transplantation with little or toxicity. *J Clin Oncol* 1996;14(6):1839–47.
40. Williams S.F., Lee W.J., Bender J.G. et al. Selection and expansion of peripheral blood CD34⁺ cells in autologous stem cell transplantation for breast cancer. *Blood* 1996;87(5):1687–91.
41. Spall E., Quinones R., Giller R. et al. Transplantation of *ex vivo* expanded cord blood. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;8:368–76.

42. Pecora A., Stiff P., Jennis A. et al. Prompt and durable engraftment in two older adult patients with high risk chronic myelogenous leukemia (CML) using *ex vivo* expanded and unmanipulated unrelated umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant* 2000;25:797–9.
43. Jaroscak J., Goltry K., Smith A. et al. Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with *ex vivo* expanded UCB cells: results of a phase I trial using the Aastrom Replicell System. *Blood* 2003;101:5061–67.
44. Peled T., Landau E., Prus E. et al. Cellular copper content modulates differentiation and self-renewal in cultures of cord blood-derived CD34⁺ cells. *Br J Haematol* 2002;116:655–61.
45. Peled T., Gluckman E., Hasson N. et al. Chelatable cellular copper modulates differentiation and self-renewal of cord blood-derived hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 2005;33:1092–1100.
46. Peled T., Mande J. Pre-clinical development of cord blood-derived progenitor cell graft expanded *ex vivo* with cytokines and the polyamine copper chelator tetraethylenepentamine. *Cytotherapy* 2004;6(4):344–55.
47. De Lima M., McMannis J., Gee A., et al. Transplantation of *ex vivo* expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase I/II clinical trial. *Bone Marrow Transplant* 2006;41(9):771–8.
48. Robinson S., Niu T., de Lima M. et al. *Ex vivo* expansion of umbilical cord blood. *Cytotherapy* 2005;7(3):243–50.
49. Li K., Ooi V.E., Chuen C.K. The plant mannose-binding lectin NTL preserves cord blood haematopoietic stem/progenitor cells in long-term culture and enhances their *ex vivo* expansion. *Br J Haematol* 2008;140(1):90–8.
50. Gabius H.J., Gabius S., Zemlyanukhina T.V. et al. Reverse lectin histochemistry: design and application of glycoligands for detection of cell and tissue lectins. *Histol & Histopathol* 1993;8:369–83.
51. Chivu M., Diaconu C.C., Bleotu C. et al. The comparison of different protocols for expansion of umbilical-cord blood hematopoietic stem cells. *J Cell Mol Med* 2004;8(2):223–31.
52. Jang Y.K., Jung D.H., Jung M.H. et al. Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for *ex vivo* expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Ann Hematol* 2006;85:212–25.
53. Moreau I., Duvert V., Caux C. et al. Myofibroblastic stromal cells isolated from human bone marrow induce the proliferation of both early myeloid and B-lymphoid cells. *Blood* 1993;82:2396–405.
54. Cherry, Yasumizu R., Toki J. et al. Production of hematopoietic stem cell-chemotactic factor by bone marrow stromal cells. *Blood* 1994;83:964–71.
55. Guerriero A., Worford L., Holland H.K. et al. Thrombopoietin is synthesized by bone marrow stromal cells. *Blood* 1997;90:3444–55.
56. Zhang Y., Li C., Jiang X. et al. Human placenta-derived mesenchymal progenitor cells support culture expansion of long-term culture-initiating cells from cord blood CD34⁺ cells. *Exp Hematol* 2004;32:657–64.
57. Erices A., Conget P., Minguell J.J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000;109:235–42.
58. Goodwin H.S., Bicknese A.R., Chien S.N. et al. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001;7:581–8.
59. Ye Z.Q., Burkholder J.K., Qiu P. et al. Establishment of an adherent cell feeder layer from human umbilical cord blood for support of long-term hematopoietic progenitor cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:12140–4.
60. McNiece I., Harrington J., Turney J. et al. *Ex vivo* expansion of cord blood mononuclear cells on mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* 2004;6:311–7.
61. Walenda T., Bork S., Horn P. et al. Co-culture with mesenchymal stromal cells increases proliferation and maintenance of haematopoietic progenitor cells. *J Cell Mol Med* 2010;14(1–2):337–50.
62. McNiece I., Kubečov D., Kerzic P. et al. Increased expansion and differentiation of cord blood products using a two-step expansion culture. *Exp Hematol* 2000;28(10):1181–6.
63. Pecora A.L., Stiff P., LeMaistre C.F. et al. A phase II trial evaluating the safety and effectiveness of the AastromReplicell system for augmentation of low-dose blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001;28(30):295–303.
64. Meissner P., Herfurth C., Schroder B., Biselli M. Development of a fixed bed bioreactor for the expansion of human hematopoietic progenitor cells. *Cytotherapy* 1999;30(1–3):227–34.
65. Liu Y., Liu T., Fan X. et al. *Ex vivo* expansion of hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood in rotating wall vessel. *J Biotechnol* 2006;124(3):592–601.
66. Bjornsson J.M., Larsson N., Brun A.C. et al. Reduced proliferative capacity of hematopoietic stem cells deficient in *Hoxb3* and *Hoxb4*. *Mol Cell Biol* 2003;23:3872–83.
67. Miyake N., Brun A.C., Magnusson M. et al. *HOXB4*-induced self-renewal of hematopoietic stem cells is significantly enhanced by p21 deficiency. *Stem Cells* 2006;24(3):653–61.
68. Sauvageau G., Thorsteinsdottir U., Eaves C.J. et al. Overexpression of *HOXB4* in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations *in vitro* and *in vivo*. *Genes Dev* 1995;9:1753–65.
69. Zhu J., Gianolla D., Zhang Y. et al. NFYa, b, c interacts with USF1/2 to activate the *HOXB4* promoter in human hematopoietic cells and repress granulopoiesis. *Blood* 2003;102:2420–7.
70. Stier S., Cheng T., Dombkowski D. et al. Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal *in vivo* and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood* 2002;99(7):2369–78.
71. Reya T., Duncan A.W., Ailles L. et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 2003;423(6938):409–14.
72. Duncan A.W., Rattis F.M., DiMascio L.N. et al. Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol* 2005;6(3):314–22.
73. Zhou S., Hayward S.D. Nuclear localization of CBF1 is regulated by interactions with the SMRT corepressor complex. *Mol Cell Biol* 2001;21:6222–32.
74. Varnum-Finney B., Purton L.E., Yu M. et al. The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells. *Blood* 1998;91(11):4084–91.
75. Karanu F.M., Murdoch B. The Notch Ligand Jagged-1 Represents a Novel Growth Factor of Human Hematopoietic Stem Cells. *J Exp Med* 2000;192(9):1365–72.
76. Delaney C., Varnum-Finney B., Aoyama K. et al. Dose-dependent effects of the Notch ligand Delta1 on *ex vivo* differentiation and *in vivo* marrow repopulating ability of cord blood cells. *Blood* 2005;106(8):2693–9.
77. Varnum-Finney B., Brashem-Stein C., Bernstein I.D. Combined effects of Notch signaling and cytokines induce a multiple log increase in precursors with lymphoid and myeloid reconstituting ability. *Blood* 2003;101(5):1784–9.
78. Delaney C., Heimfeld C., Brashem-Stein C. et al. Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. *Nat Med* 2010;16:232–6.
79. Trowbridge J.J., Xenocostas A., Moon R.T., Bhatia M. Glycogen synthase kinase-3 is an *in vivo* regulator of hematopoietic stem cell repopulation. *Nat Med* 2006;12(1):89–98.
80. Arai F., Hirao A., Ohmura M. et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 2004;118(2):149–61.
81. Delaney C., Ratajczak M.Z., Laughlin M.J. Strategies to enhance umbilical cord blood stem cell engraftment in adult patients. *Expert Rev Hematol* 2010;3(3):273–83.
82. Mazur M.A., Davis C.C., Szabolcs P. *Ex vivo* expansion and Th1/Tc1 maturation of umbilical cord blood T cells by CD3/CD28 costimulation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14(10):1190–6.
83. Boissel L., Tuncer H.H., Betancur M. et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells increase expansion of cord blood natural killer cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14(10):1031–8.
84. Neildez-Nguyen T.M., Wajcman H., Marden M.C. et al. Human erythroid cells produced *ex vivo* at large scale differentiate into red blood cells *in vivo*. *Nat Biotechnol* 2002;20(5):467–72.