

ТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК *EX VIVO* ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Т.В. Шаманская^{1,2}, Е.Ю. Осипова^{1,2}, С.А. Румянцев^{1,2}

¹ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии Минздрава России, Москва; ²ГУЗ Банк стволовых клеток Департамента здравоохранения г. Москвы

Контакты: Татьяна Викторовна Шаманская totti111@list.ru

В настоящее время мезенхимальные стволовые клетки (МСК) находят все более широкое клиническое применение в различных областях медицины. Однако, несмотря на потребность в больших количествах человеческих МСК для клинической практики, имеется ограниченная информация относительно оптимизации условий культивирования, требуемых для их продукции. В настоящей статье обобщены данные литературы, касающиеся различных условий выделения и культивирования МСК. Рассмотрено влияние основной среды, плотности пассажа клеток, наличия или отсутствия эмбриональной телячьей сыворотки и других параметров на пролиферацию МСК. Представлены данные об использовании трехмерных структур и различных видов биореакторов для *ex vivo* экспансии МСК. Рассмотрены особенности мультилинейной дифференцировки МСК.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, культивирование *ex vivo*, дифференцировка, клеточные культуры

MESENCHYMAL STEM CELLS *EX VIVO* CULTIVATION TECHNOLOGIES FOR CLINICAL USE

T.V. Shamanskaya^{1,2}, E.Yu. Osipova^{1,2}, S.A. Roumiantsev^{1,2}

¹Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow; ²Moscow Stem Cells Bank, Moscow

Now mesenchymal stem cells (MSC) are more widely applied in different areas of medicine. However, despite requirement for considerable quantities of human MSC for clinical practice, there is restricted information concerning culture conditions optimization required for their production. In present article the literature review, concerning various conditions of MSC extraction and culture, is presented. Influence of culture medium, cells passage density, fetal calf serum presence or absence and other conditions on MSC proliferation is surveyed. Data concerning use of three-dimensional structures and various bioreactors for *ex vivo* expansion are presented. MSC multilineage differentiation features are surveyed.

Key words: mesenchymal stem cells, *ex vivo* expansion, differentiation, cell cultures

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) являются частью микроокружения костного мозга и играют важную роль в поддержании и регулировании пролиферации и дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) [1, 2]. В настоящее время показано, что МСК имеют большой терапевтический потенциал из-за их способности к самообновлению и дифференцировке в различные ткани [3], включая остеобласты, адипоциты, хондроциты, миоциты, нейроны, глиальные клетки и гепатоциты при определенных условиях [4–8]. В ряде исследований было продемонстрировано, что МСК способны подавлять пролиферацию Т-лимфоцитов *in vitro* и угнетать дифференцировку дендритных клеток и, таким образом, оказывают иммуносупрессивное действие [9]. Это свойство МСК используется в трансплантологии для подавления реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ). Кроме того, W.A. Noort и соавт. [10] показали, что МСК влияют также на приживление ГСК. В настоящее время культивированные МСК пытаются использовать в ортопедии, хирургии, кардиологии, неврологии.

Первоначально МСК были изолированы из костного мозга, стромы селезенки и тимуса, в дальнейшем были описаны другие источники МСК, например трабекулярная кость [11, 12]. МСК также найдены в жировой и хрящевой ткани, стенке сосудов, синовиальной жидкости и надкостнице [13, 14]. В костном мозге человека МСК составляют 0,001–0,01% от всех ядросодержащих клеток [15]. S.A. Wexler и соавт. [16] определили, что частота встречаемости МСК в костном мозге взрослого человека — 1 клетка на 34×10^6 ядросодержащих клеток. Авторы показали в своем исследовании, что наилучшим источником МСК для проведения исследований и применения в разработке клеточных методов терапии является костный мозг взрослого человека по сравнению с пуповинной и периферической кровью.

Впервые клиническое применение МСК, полученное путем экспансии *ex vivo*, было продемонстрировано в пилотном исследовании 15 добровольцев и показало безопасность *ex vivo* экспансии и последующего внутривенного (в/в) введения аутологичных МСК [17]. В исследование были включены

пациенты со злокачественными гематологическими заболеваниями, которые на момент сбора и культивирования МСК находились в стадии ремиссии, и которым не проводилась полихимиотерапия. Не отмечено никакой токсичности при в/в введении аутологичных МСК в дозе от 1×10^6 до 50×10^6 .

В I—II фазе клинических испытаний были оценены безопасность, выполнимость и гематопозитивные эффекты после в/в введения культивированных аутологичных МСК у больных раком молочной железы, перенесших высокодозную химиотерапию (ХТ) с введением ГСК [18]. Относительно маленькие объемы костного мозга (25 мл) получали при пункции гребней подвздошных костей. МСК культивировались *ex vivo*. При в/в введении МСК больным в дозе от 1×10^6 до $2,2 \times 10^6$ /кг никаких побочных эффектов не зафиксировано. У 13 из 21 больного культивированные МСК были обнаружены в крови в течение 60 мин после введения, что указывало на выживаемость МСК и короткое персистирование в кровяном русле. Восстановление гемопоэза у этих пациентов было быстрым (нейтрофилы >500 на 8-й день, тромбоциты $>20\,000$ на 8,5 дня). Но из-за того что всем пациентам вводились CD34⁺-клетки периферической крови, роль МСК в восстановлении гемопоэза точно подтверждена не была. Впоследствии для оценки роли МСК в восстановлении гемопоэза были предприняты рандомизированные исследования. Выделили 2 группы больных: те, кому после проведения высокодозной ХТ вводились культивированные МСК в дозе 2×10^6 /кг, и те, кому МСК не вводились. Предварительные данные показали, что МСК ускоряют гематологическое приживление [18].

В дальнейшем с учетом иммунологической инертности МСК предприняты попытки к использованию для введения больным аллогенных донорских МСК.

В Онкологическом центре Ирландии (Ireland Cancer Center) были начаты исследования по введению пациентам с лимфомами аллогенных МСК, полученных от донора. В некоторых центрах Европы и США изучали введение аллогенных МСК больным с онкологическими и генетическими заболеваниями при проведении аллогенной трансплантации костного мозга или введении периферических стволовых клеток. Предварительные данные свидетельствуют о положительном эффекте от введения МСК по сравнению с исторической контрольной группой. Исследования в этой области продолжаются.

В настоящее время клиническое применение МСК развивается быстрыми темпами как в трансплантологии — для улучшения приживления гемопоэтических клеток, снижения степени РТПХ, так и при лечении болезней обмена и для поставки множества терапевтических генов. В связи с этим появляется потребность в большом количестве культивированных МСК.

Культивирование

Число клеток, полученных после экспансии, напрямую зависит от возраста и пола донора, наличия у него травм и системных заболеваний [19—21]. Так, например, МСК, выделенные от пациентов с гепатитом В, дают более низкую кривую роста, хотя фенотипические характеристики не изменены и МСК экспрессируют те же самые иммунологические маркеры [19]. В исследовании А. Muraglia и соавт. [22] не отмечено какой-либо зависимости между фенотипом МСК, эффективностью клонирования и возрастом доноров костного мозга. В других работах не установлено зависимости между потенциалом хондрогенной дифференцировки и возрастом и полом донора [23].

Технические проблемы культивирования связаны, как правило, с методикой, используемой для экспансии, средой, количеством пассажей и рядом других факторов. Экспансия МСК может происходить за короткое время. Так, тысячекратного увеличения можно добиться путем культивирования в течение 2—3 нед [24]. МСК в культуре могут пролиферировать до 19 удвоений, не теряя при этом способности к пролиферации и дифференцировке [22]. Тем не менее проведение экспансии показало, что дифференцировочный потенциал постепенно уменьшается [25]. При длительном культивировании ухудшаются функции клеток, развивается апоптоз [21, 26]. Однако ретровирусная трансдукция гена человеческой теломеразы позволяет увеличить продолжительность жизни МСК до 260 удвоений, не теряя при этом мультилинейной дифференцировки [27]. С другой стороны, есть данные о том, что длительное культивирование может закончиться спонтанной трансформацией МСК, в результате чего они приобретут онкогенный потенциал [28]. В связи с этим необходимо идти на компромисс между количеством и качеством экспансированных клеток.

Поскольку МСК не экспрессируют четко определенные маркеры, то их выделение основано на способности прилипать к пластику [15]. Впервые это свойство МСК было описано А.Я. Фриденштейном и соавт. [11]. В этом исследовании цельный костный мозг культивировался на пластике. Через 4 ч неприлипающие клетки отмывались. Отмечено, что прилипающие клетки находились в покое в течение 2—4 дней, а затем быстро пролиферировали. Модификация этого протокола используется в настоящее время для культивирования МСК. Полученный объем костного мозга центрифугируют по градиенту плотности. При этой технике используются растворы с высокой плотностью (1,077 г/мл), низкой вязкостью и низким осмотическим давлением (Ficoll, Percoll). Это позволяет выделить моноклеарную фракцию костного мозга, содержащую МСК [29]. Была проведена работа по применению Ficoll с плотностью 1,073 г/мл, которая продемонстрировала, что с данной средой можно получить существ-

венно большее число МСК, чем при использовании для выделения клеток раствора Ficoll с плотностью 1,077 г/мл. При применении раствора Ficoll с более низкой плотностью значительно уменьшалось содержание CD45⁺-клеток и увеличивалось в 1,4 раза содержание CD45⁺/CD105⁺/CD90⁺/GD2⁺-клеток [30].

Для культивирования МСК наиболее часто используется среда Eagle's, модифицированная Dulbecco (DMEM), однако возможно применение и других сред. Это DMEM-LG с низким содержанием глюкозы (1 мг/мл) (Romanov и соавт., 2003), DMEM с низким содержанием глюкозы и L-глутамином (DMEM/LG/L-G), MEM (Quirici и соавт., 2002), а также DMEM-LG с MCD201 — 60—40% (Lennon и соавт., 1995) и др. Первичные культуры обычно поддерживаются в течение 10—12 дней с отмыванием от неприлипшей фракции гемопоэтических клеток. Условия культивирования включают инкубацию клеток с постоянной температурой 37°C во влажной атмосфере с 95% содержанием кислорода и добавлением 5% углекислого газа. Обычно питательные среды меняют каждые 2—3 дня. Когда клетки достигают монослоя, они обрабатываются трипсином, отмываются и собираются в новые флаконы.

С учетом отсутствия единых подходов к изоляции и экспансии МСК P.A. Sotiropoulou и соавт. [31] сравнивали условия культивирования МСК и влияние на него различных факторов с целью выработки оптимального протокола для культивирования МСК в больших количествах для дальнейшего их использования в клинической практике с сохранением их иммуносупрессивных свойств и мультилинейности. Было изучено влияние различных питательных сред, качества пластиковых флаконов, применения сыворотки, плотности пассажа клеток. Оценивалось влияние основного фактора роста фибробластов (bFGF) на экспансию МСК.

Используя различные питательные среды, авторы показали их существенное влияние на культивирование МСК. Однако они были едины во мнении, что среды, основанные на aMEM, более всего подходят для изоляции и экспансии МСК. В дальнейшем культивирование производилось на питательной среде aMEM/GL с различной плотностью пассажа клеток (от 1000 до 200 000 клеток/см²). Оптимальные условия для культивирования были достигнуты при плотности пассажа 1000 клеток/см², при этом их фенотип, иммуносупрессивные свойства, колониеобразующая активность, мультилинейный дифференцировочный потенциал *in vitro* не изменялись.

В других исследованиях также установлено, что плотность пассажа влияет на экспансию МСК. Условия культивирования были лучше при низкой плотности пассажа (N. Beyer Nardi, L. da Silva Meirelles, Colter).

Среды, которые сегодня используются для экспансии МСК, содержат инактивированную эмбриональную бычью или телячью сыворотку (FBS или FCS соответственно). Если для доклинических исследований применение сыворотки животных при культивировании не имеет столь большого значения, то различные регулирующие органы требуют более высоких стандартов безопасности при проведении клинических исследований на людях.

Важной проблемой при использовании сред с содержанием сыворотки животных является возможность передачи бактериальных и вирусных инфекционных агентов, а также прионов (болезнь Крейтцфельда — Якоба), развитие иммунных и локальных воспалительных реакций из-за контаминации бычьими белками, которые не могут быть исключены даже при проведении нескольких отмывок после экспансии. Это, в свою очередь, может привести к формированию антител, неприживлению или отторжению перелитых МСК, особенно если они вводились неоднократно. Описано развитие жизнеугрожающих аритмий у пациентов с заболеваниями сердца, которым вводились МСК, культивированные с добавлением FCS. При этом замена бычьей сыворотки на аутологичную предотвращала развитие подобных осложнений. Кроме того, в ряде стран регулирующими органами запрещено использование животной сыворотки.

Различные исследователи продемонстрировали, что использование различных партий эмбриональной телячьей сыворотки может привести к фенотипическим изменениям МСК. Этот факт указывает на влияние на селекцию и экспансию МСК неизвестных факторов (N. Beyer Nardi, L. da Silva Meirelles). В связи с этим проводятся попытки применения для экспансии МСК бессывороточных сред, аутологичной или аллогенной человеческой сыворотки.

В литературе существуют противоречивые данные по применению для экспансии МСК аутологичной сыворотки. Ряд авторов выявили ее преимущество перед FCS [32], другие этого преимущества не отметили [33—37]. N. Stute в своей работе показал, что МСК, культивированные в среде с добавлением 10% аутологичной сыворотки, морфологически не отличаются от МСК, выращенных с добавлением FCS. При этом клетки обладали равным пролиферативным потенциалом и сохраняли способность к мультилинейной дифференцировке. Вместе с тем у МСК, выращенных с добавлением аутологичной сыворотки, обнаружена более высокая способность к остеогенной дифференцировке, и, таким образом, данные условия культивирования могут рассматриваться для использования МСК при регенерации костных дефектов в ортопедии. Применение аутологичной сыворотки в меньшей концентрации (1, 3%) не позволяет добиться таких хороших результатов при культивировании,

однако при использовании более высоких концентраций сыворотки следует принимать во внимание необходимость получения большого количества крови [38]. Другим ограничением является колебание уровня ростовых факторов у пациентов после предшествующих курсов ХТ.

Рядом авторов были предприняты попытки применения бессывороточных сред. При использовании бессывороточной среды (UC) с добавлением 2% заменителя сыворотки ULTROSER (который содержит все факторы, необходимые для роста клеток, — факторы роста, витамины, гормоны, связывающие белки) авторы получили лучшие результаты экспансии и пролиферации МСК по сравнению с питательной средой α MEM с 15% FCS. Применение этой питательной среды позволяло МСК сохранять свой мультилинейный потенциал и способность поддерживать гемопоэз, а наличие в ней антиоксидантов улучшало жизнеспособность клеток. Кроме того, эта среда позволяла быстрее удалить CD 45⁺-клетки [39].

Ряд исследователей использовали для экспансии человеческую свежесзамороженную плазму с лизатом тромбоцитов [40]. Авторы исходили из того, что такая среда является естественным источником фактора роста, полученного из тромбоцитов (PDGF), который играет важную роль в пролиферации МСК. При добавлении к питательной среде DMEM-LG 2,5% свежесзамороженной плазмы кинетика пролиферации МСК зависела от концентрации тромбоцитов и была максимальной при показателе 10⁸ тромбоцитов/мл, что является физиологическим значением. При увеличении концентрации плазмы до 5% пролиферация МСК возрастала и уже не зависела от концентрации тромбоцитов. Авторы продемонстрировали, что МСК, выращенные в среде с плазмой и добавлением тромбоцитов, обладали сходными морфологическими, иммунологическими характеристиками и потенциалом дифференцировки с МСК, выращенными с использованием FCS.

Добавление в среду для культивирования МСК других факторов роста, например фактора роста фибробластов-2 (FGF-2), поддерживает их дифференцировочный потенциал. Несмотря на то что этот эффект не наблюдался в исследованиях с мышиными МСК [41], добавление FGF-2 при культивировании приводит к селекции клеток с увеличенной длиной теломера [42]. При добавлении в среду для культивирования FGF-2 Р.А. Sotiropoulou установил, что МСК меняют свою морфологию и фенотип (теряют веретенообразную форму, отмечается дозозависимое увеличение экспрессии HLA-DR, уменьшение экспрессии CD44). При добавлении FGF-2 в среду в концентрации > 5 нг/мл иммуносупрессивные свойства МСК были выше, что имеет важное значение в трансплантологии при лечении РТПХ. Важно, что в этом исследовании не было показано влияния

сред с добавлением FGF-2 на развитие опухоли. Что касается влияния этого фактора на дифференцировку МСК, то остеогенный и (в значительно меньшей степени) адипогенный потенциалы были увеличены, а способность к нейрогенной трансформации МСК — снижена. Остеогенная дифференцировка МСК *in vivo* была более выражена при увеличении концентрации FGF-2 > 5 нг/мл.

На выделение и проведение культивирования оказывает влияние также качество пластиковой поверхности, используемой как для выделения, так и для культивирования МСК. В исследовании, оценивавшем эффективность культивирования МСК в зависимости от свойств адгезивной поверхности, использовались флаконы 4 различных компаний. Лучшие результаты культивирования были показаны при использовании мешков фирмы «Falcon», по сравнению с «Costar», «Nunc», «Greiner». Качество пластика влияло на пролиферативный потенциал, но не оказывало влияния на качественные характеристики клеток.

Однослойное культивирование — основная и наиболее экономичная техника, используемая для экспансии МСК. Для этого обычно применяют чашки Петри, культуральные флаконы, стаканы и др. Качество пластика, как уже упоминалось, особенно важно для того, чтобы гарантировать наилучшее прилипание клеток к стенкам сосуда. В то же время у этого метода обнаружены и отрицательные моменты, одним из которых является снижение дифференцировочного потенциала с увеличением количества пассажей. Выявлено, что когда клетки нуждаются в имплантации, данный метод культивирования может нарушить их остеогенный и хондрогенный потенциал [43]. В этом исследовании показано, что активность щелочной фосфатазы (ЩФ) и содержание остеокальцина были значительно снижены по сравнению с трехмерными культурами. Это же относится и к хондрогенной дифференцировке. Хондроциты в однослойных культурах становятся фибробластоподобными со сниженной способностью продуцировать протеогликаны, изменяется структура синтезируемого коллагена (вместо коллагена II типа синтезируется коллаген I типа) [44].

Трехмерные статические культуры для экспансии МСК полностью не исследованы. В течение предшествующих лет было разработано множество трехмерных систем для культивирования МСК. Материалами для них служили альгинат [45], гиалуроновая кислота [46], коллаген [47], фибрин [48] и цитозан [49], которые использовались как структуры для инкапсулирования и поддержки МСК. J.F. Markusen и соавт. [45], изучавшие использование для культивирования альгинатных структур, показали, что, несмотря на жизнеспособность клеток, они не пролиферировали в течение 2 нед. О незначительном снижении прироста клеток сообща-

ли и другие исследователи [46, 50]. С другой стороны, рост числа клеток отмечался при использовании цитозан-желатинового полимера [49].

Немаловажное значение имело культивирование МСК в фибриновом геле для дальнейшего их применения при исправлении костных дефектов. Определены оптимальная концентрация фибриногена (18 мг/мл) и тромбиновая активность (100 ЕД/мл) для наилучшего распространения и пролиферации МСК в данной среде. При большей концентрации фибриногена гель будет более плотным, что снизит пролиферацию клеток. В этом исследовании выявлено, что фибриновый гель с МСК посредством окружения кораллового имплантата у мышей защищает место имплантации от проникновения других клеток организма, что может играть важную роль при клиническом использовании [48].

S. Cristino и соавт. культивировали МСК в трехмерной системе с добавлением производной гиалуроновой кислоты (HYAFF 11). С помощью микроскопии продемонстрировано сохранение жизнеспособности МСК после 6 дней культивирования в данной среде при концентрации $7,5 \times 10^6$ клеток/0,4 см³. При большей концентрации клеток во внутренней части среды происходила их гибель. Это могло быть связано с апоптозом клеток и/или низкими уровнями метаболизма и газообмена во внутренней части системы. МСК меняли свою морфологическую форму с округлой на веретенообразную, вероятнее всего, для того, чтобы МСК быстрее приспособились к волокнам трехмерной среды, чтобы их лучше обернуть и колонизировать. МСК, выращенные на HYAFF 11, экспрессировали на своей поверхности коллаген I (обеспечивающего прочность связок) и III типа, фибронектин, ламинин и актин в различных концентрациях. Эта работа показала, что в дальнейшем культивирование МСК в данной среде может быть использовано в клинических условиях для репарации поврежденных связок.

Альтернативой статическим методам экспансии является культивирование МСК в биореакторах. В биореакторах создаются условия, имитирующие *in vivo* среду для роста клеток. В этих условиях происходит микрогравитация, эффективное поступление питательных веществ к клеткам и удаление продуктов метаболизма. Существует несколько типов биореакторов: перфузионные [51], концентрические цилиндрические [52] и ротационные [53]. В результате применения биореакторов предполагается увеличить число клеток без изменения их фенотипа и дифференцировочного потенциала.

Для биореакторов характерно наличие важных параметров, влияющих на выживание клеток: режим периодического обновления среды в культуре клеток, удаление продуктов метаболизма. В них создаются условия, имитирующие *in vivo* условия для роста и размножения клеток.

X. Chen и соавт. [53] установили, что применение ротационного биореактора с модифицированной питательной средой Myelocult, с добавлением фактора роста стволовых клеток (SCF), интерлейкина-3 (ИЛ-3) и интерлейкина-6 (ИЛ-6) может быть использовано для быстрой экспансии МСК. В своей работе J. Tong и соавт. [54] выявили, что введение SCF больным раком молочной железы после проведения ХТ увеличивало абсолютное число CD34⁺-клеток и примитивных миелоидных клеток-предшественников. Относительно действия ИЛ-3 имеются противоречивые данные, указывающие на его способность как стимулировать, так и ингибировать экспансию стволовых клеток. Продемонстрировано, что ИЛ-3 уменьшал экспансию и самовозобновление примитивных стволовых клеток в зависимости от концентрации [55]. В исследовании X. Chen и соавт. [53] отмечено, что ИЛ-3 оказывал положительное влияние на пролиферацию МСК и ГСК. ИЛ-6 стимулирует экспансию МСК, положительно влияет на восстановление гемопоэза после трансплантации ГСК и, кроме того, оказывает противоопухолевое действие [56]. Последнее свойство ИЛ-6 может применяться при заборе костного мозга для очистки его от злокачественных клеток [57].

В ротационном биореакторе, который применяли в своей работе X. Chen и соавт., вначале использовали высокие дозы цитокинов, а затем переходили к более низкой концентрации при первой смене питательной среды. Это позволяло оптимизировать условия экспансии. Была выбрана оптимальная частота вращения биореактора (20 оборотов в минуту), которая позволяла предотвратить агрегацию клеток в течение периода экспансии в биореакторе.

Для идентификации МСК, полученных в результате осуществления экспансии, используют морфологические, фенотипические характеристики клеток, а также их способность дифференцироваться *in vitro* в кость, хрящ, жир.

В настоящее время нет ни одного маркера, который позволял бы четко определить МСК. Они экспрессируют различные поверхностные маркеры, включая CD9, CD10, CD13, CD44, CD54, CD55, CD90, CD105, CD166, D7-FIB, и негативны в отношении CD14, CD34, CD45 и CD133 (см. таблицу).

Дифференцировка

Для остеогенной дифференцировки в основную питательную среду с 20% сывороткой добавляют дексаметазон, В-глицерофосфат и фосфат витамина С. При культивировании МСК в монослойной среде с добавлением этих факторов в течение 2—3 нед клетки приобретают костную морфологию, повышается активность ЩФ с депонированием кальция в экстрацеллюлярном матриксе. Скопления клеток окрашиваются ализарином красным с использованием техники von Kossa.

Маркеры МСК

Поверхностный маркер	Антитело	Название столбца*
Т-лимфоциты	CD3	—
Миелоидные клетки	CD13	+
Моноциты	CD14	—
В-лимфоциты	CD19	—
Рецептор ИЛ-2	CD25	—
b ₁ -Интегрин	CD29	+
PECAM	CD31	—
Стволовые клетки	CD34	—
Активация лимфоцитов	CD38	—
HCAM-1	CD44	+
Общий лейкоцитарный АГ	CD45	—
SH3	CD73	+
Thy-1	CD90	+
Эндоглин, SH2	CD105	+
VCAM-1	CD106	+
Стволовые клетки	CD133	—
SB 10/ALKAM	CD166	+
HLA-DR	Анти-HLA-DR	— (при воздействии IFN γ)
Дифференцировка в адипоциты		+
Остеобласты		+
Хондробласты		+
Нейральные клетки		+
Миобласты		+
Эндотелиальные клетки		+

*(+) — позитивные маркеры, (—) — негативные маркеры.

Для инициации хондрогенной дифференцировки МСК центрифугируются с целью образования гранулированной микромассы, и в среду добавляется трансформирующий фактор роста- β (TGF- β) [58]. При окрашивании красителем толуидиновым синим выявляется обилие гликозаминогликанов во внеклеточном матриксе [59]. Для хондрогенной дифференцировки используются бессывороточные среды с добавлением дексаметазона, фосфата витамина С, TGF- β , пролина.

А.М. Maskay [58], М.Ф. Pittenger и соавт. [5] выявили положительное влияние среды с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л) на хондрогенную дифференцировку МСК при культивировании в pellet-культуру (гранулярная). Высокий уровень глюкозы в среде изменял клеточный метаболизм в сторону уменьшения чувствительности клеток к апоптозу.

Следует отметить, что эти данные не распространяются на культивирование МСК в моно-слое. В pellet-культуре важны межклеточные отношения и взаимодействия между клетками и матриксом. Кроме того, такое культивирование может вызвать хондрогенез, так как клетки принимают компактную форму, а не распространяются по поверхности. При культивировании в данной среде клетки быстро теряют фибробластическую морфологию и начинают экспрессировать хрящ-специфичные компоненты в экстрацеллюлярном матриксе. Начинается биосинтез глюкозаминогликанов и клетки меняют свою морфологию. Кроме того, клетки продуцируют коллаген II типа, типичный для суставного хряща [1].

Адипогенная дифференцировка МСК достигается путем добавления в среду дексаметазона, инсулина, изобутилметилксантина и индометацина. При культивировании МСК клетки приобретают вакуоли, заполненные жиром, и экспрессируют рецептор пероксисом-2, активизирующий пролиферацию (peroxisome proliferation-activated receptor-2), липопротеиновую липазу и белок, связывающий жирные кислоты (fatty acid-binding protein aP2). Вакуоли сливаются и заполняют всю клетку. Заполненные жиром вакуоли можно выявить гистологически при окраске красным маслом О.

Установлено, что 5-азациитидин индуцирует миогенез в эмбриональных и взрослых клетках [60] и стромальных клетках у крыс [61]. D.G. Phinney и соавт. [41] выявили, что добавление к МСК, выделенным от мышей, амфотерицина, а не 5-азациитидина, приводило к появлению многоядерных волокон, напоминающих мышечные трубочки.

Индукция мышинных, крысиных и человеческих МСК по нейрогенному пути была описана многими авторами [62—64]. Добавление изобутилметилксантина вызывало экспрессию ранних маркеров нейрональной дифференцировки [62], так же как и эпидермальный фактор роста или нейротрофический фактор в питательной среде для экспансии нейронов [65]. Добавление к МСК крыс диметилсульфоксида в присутствии фактора роста фиб-

робластов и плацентарного фактора роста также успешно стимулировало нейрогенную дифференцировку клеток [64, 66].

В последнее время показания для применения МСК в клинической практике расширены. Мезенхимальные клетки применяют в трансплантологии, кардиологии, ортопедии, неврологии. В связи с этим особую актуальность принимают исследования, направленные на оценку безопасности ис-

пользования МСК, выявление близких и отдаленных последствий применения их у человека, стандартизацию протоколов экспансии, контроль качества конечного продукта (иммунофенотипическая панель, вирусологический, бактериологический контроль и др.), обнаружение генетических аномалий при длительном культивировании МСК и создание на основе всего этого единого паспорта клеточного продукта.

Л и т е р а т у р а

1. Fouillard L., Chapel A., Bories D. et al. Infusion of allogeneic-related HLA mismatched mesenchymal stem cells for the treatment of incomplete engraftment following autologous haematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia* 2007;21:568—70.
2. Zhao Z.-G., Liang Y., Li K. et al. Phenotypic and functional comparison of mesenchymal stem cells derived from the bone marrow of normal adults and patients with hematologic malignant diseases. *Stem cell develop* 2007;16:637—48.
3. Zhao Z., Tang X., You Y. et al. Assessment of bone marrow mesenchymal stem cell biological characteristics and support hemopoiesis function in patients with chronic myeloid leukemia. *Leuk Res* 2006;30:993—1003.
4. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cell derived from adult marrow. *Nature* 2002;9:418—41.
5. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143—7.
6. Makino S., Fukuda K., Miyoshi S. et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999;103:697—705.
7. Young R.G., Butler D.L., Weber W. et al. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res* 1998;16:406—13.
8. Filvaroff E.H., Derynck R. Induction of myogenesis in mesenchymal cells by myoD depends on their degree of differentiation. *Dev Biol* 1996;178:459—71.
9. Alma J., Fibbe N., Fibbe W.E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007;110:3499—506.
10. Noort W.A., Kruisselbrink A.B., Anker P.S. et al. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34+ cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* 2002;30:870—8.
11. Friedenstein A.J., Gorskaja J.F., Kulagina N.N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976;4:267—74.
12. Tuli R., Seghatoleslami M.R., Tuli S. et al. A simple, highyield method for obtaining multipotential mesenchymal progenitor cells from trabecular bone. *Mol Biotechnol* 2003;23:37—49.
13. Minguell J.J., Erices A., Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 2001;226:507—20.
14. Pountos I., Jones E., Tzioupis C. et al. Growing bone and cartilage. The role of mesenchymal stem cells. *J Bone Joint Surg Br* 2006;88:421—6.
15. Gnecci M., Melo L.G. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral transduction, and production of conditioned medium. *Methods Mol Biol* 2009;482:281—94.
16. Wexler S.A., Donaldson C., Denning-Kendall P. et al. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 2003;121:368—74.
17. Lazarus H., Haynesworth S., Gerson S. et al. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant* 1995;16:557—64.
18. Koc O., Gerson S., Cooper B. et al. Rapid hematopoietic recovery after co-infusion of autologous culture-expanded human mesenchymal stem cells (hMSCs) and PBPCs in breast cancer patients receiving high dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000;18:307—16.
19. Peng L., Li H., Gu L. et al. Comparison of biological characteristics of marrow mesenchymal stem cells in hepatitis B patients and normal adults. *World J Gastroenterol* 2007;13:1743—6.
20. Seebach C., Henrich D., Tewksbury R. et al. Number and proliferative capacity of human mesenchymal stem cells are modulated positively in multiple trauma patients and negatively in atrophic nonunions. *Calcif Tissue Int* 2007;80:294—300.
21. Stenderup K., Justesen J., Clausen C., Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 2003;33:919—26.
22. Muraglia A., Cancedda R., Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 2000;113:1161—6.
23. Mackay M.A., Beck S.C., Murphy J.M. et al. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tis Engineer* 1998;4(4):415—28.
24. Chen S.L., Fang W.W., Ye F. et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004;94:92—5.
25. Banfi A., Muraglia A., Dozin B. et al. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol* 2000;28:707—15.
26. Digirolamo C.M., Stokes D., Colter D. et al. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 1999;107:275—81.
27. Simonsen J.L., Rosada C., Serakinci N. et al. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol* 2002;20:592—6.
28. Rubio D., Garcia-Castro J., Martin M.C. et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 2005;65:3035—9.
29. Lennon D.P., Caplan A.I. Isolation of human marrowderived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2006;34:1604—5.
30. Grisendi G., Anneren C., Cafarelli L. et al. Refining GMP-manufactured density media for optimized mesenchymal stroma/stem cell isolation and expansion. *Bone Marr Transplant* 2009;43:205.
31. Sotiropoulou P.A., Perez S.A., Salagianni M. et al. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006;24:462—71.
32. Shigeno Y., Ashton B.A. Human bone-cell proliferation in vitro decreases with human donor age. *J Bone Joint Surg Br* 1995;77:139—42.
33. Anselme K., Broux O., Noel B. et al.

- In vitro control of human bone marrow stromal cells for bone tissue engineering. *Tis Engineer* 2002;8:941—53.
34. Yamamoto N., Isobe M., Negishi A. et al. Effects of autologous serum on osteoblastic differentiation in human bone marrow cells. *J Med Dent Sci* 2003;50:63—9.
 35. Koller M.R., Maher R.J., Mancel I. et al. Alternatives to animal sera for human bone marrow cell expansion: human serum and serum-free media. *J Hematother* 1998;7:413—23.
 36. Kuznetsov S.A., Mankani M.H., Robey P.G. Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and in vivo bone formation. *Transplantation* 2000;70:1780—7.
 37. Yamaguchi M., Hirayama F., Wakamoto S. et al. Bone marrow stromal cells prepared using AB serum and bFGF for hematopoietic stem cells expansion. *Transfusion* 2002;42:921—7.
 38. Stutea N., Holtz K., Bubenheim M. et al. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Experiment Hematol* 2004;32:1212—25.
 39. Meuleman N., Tondreau T., Delforge A. et al. Human marrow mesenchymal stem cell culture: serum-free medium allows better expansion than classical α -MEM medium. *Eur J Haematol* 2006;76:309—16.
 40. Müller I., Kordowich S., Holzwarth C. et al. Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. *Cytotherapy* 2006;8(5):437—44.
 41. Phinney D.G., Kopen G., Isaacson R.L., Prockop D.J. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem* 1999;72:570—85.
 42. Bianchi G., Banfi A., Mastrogiacomo M. et al. Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Experiment Cell Res* 2003;287:98—105.
 43. Na K., Kim S.W., Sun B.K. et al. Osteogenic differentiation of rabbit mesenchymal stem cells in thermo-reversible hydrogel constructs containing hydroxyapatite and bone morphogenic protein-2 (BMP-2). *Biomaterials* 2007;28:2631—7.
 44. Benya P.D., Shaffer J.D. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982;30:215—24.
 45. Markusen J.F., Mason C., Hull D.A. et al. Behavior of adult human mesenchymal stem cells entrapped in alginate-GRGDY beads. *Tis Engineer* 2006;12:821—30.
 46. Cristino S., Grassi F., Toneguzzi S. et al. Analysis of mesenchymal stem cells grown on a three-dimensional HYAFF 11-based prototype ligament scaffold. *J Biomed Mater Res A* 2005;73:275—83.
 47. Yang X.B., Bhatnagar R.S., Li S. et al. Biomimetic collagen scaffolds for human bone cell growth and differentiation. *Tis Engineer* 2004;10:1148—59.
 48. Bensaid W., Triffitt J.T., Blanchat C. et al. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials* 2003;24:2497—502.
 49. Zhao F., Grayson W.L., Ma T. et al. Effects of hydroxyapatite in 3-D chitosan-gelatin polymer network on human mesenchymal stem cell construct development. *Biomaterials* 2006;27:1859—67.
 50. Wan C., He Q., McCaigue M. et al. Nonadherent cell population of human marrow culture is a complementary source of mesenchymal stem cells (MSCs). *J Orthop Res* 2006;24:21—8.
 51. Zhao F., Ma T. Perfusion bioreactor system for human mesenchymal stem cell tissue engineering: dynamic cell seeding and construct development. *Biotechnol Bioeng* 2005;91:482—93.
 52. Saini S., Wick T.M. Concentric cylinder bioreactor for production of tissue engineered cartilage: effect of seeding density and hydrodynamic loading on construct development. *Biotechnol Prog* 2003;19:510—21.
 53. Chen X., Xu H., Wan C. et al. Bioreactor expansion of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006;24:2052—9.
 54. Tong J., Gordon M.S., Srour E.F. et al. In vivo administration of recombinant methionyl human stem cell factor expands the number of human marrow hematopoietic stem cells. *Blood* 1993;82:784—91.
 55. Zandstra P.W., Conneally E., Petzer A.L. et al. Cytokine manipulation of primitive human hematopoietic cell self-renewal. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:4698—703.
 56. Cao X., Wang Q., Ju D.W. et al. Efficient induction of local and systemic antitumor immune response by liposome-mediated intratumoral co-transfer of interleukin-2 gene and interleukin-6 gene. *J Exp Clin Cancer Res* 1999;18:191—200.
 57. Bachier C.R., Gokmen E., Teale J. et al. Ex-vivo expansion of bone marrow progenitor cells for hematopoietic reconstitution following high-dose chemotherapy for breast cancer. *Exp Hematol* 1999;27:615—23.
 58. Mackay A.M., Beck S.C., Murphy J.M. et al. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tis Engineer* 1998;4:415—28.
 59. Kopen G.C., Prockop D.J., Phinney D.G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:10711—6.
 60. Taylor S.M., Jones P.A. Changes in phenotypic expression in embryonic and adult cells treated with 5-azacytidine. *J Cell Physiol* 1982;111:187—94.
 61. Wakitani S., Saito T., Caplan A.I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 1995;18:1417—26.
 62. Deng W., Obrocka M., Fischer I., Prockop D.J. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282:148—52.
 63. Kohyama J., Abe H., Shimazaki T. et al. Brain from bone: efficient “meta-differentiation” of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation* 2001;68:235—44.
 64. Woodbury D., Schwarz E.J., Prockop D.J., Black I.B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neuroscience Res* 2000;61:364—70.
 65. Sanchez-Ramos J., Song S., Cardozo-Pelaez F. et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exper Neurol* 2000;164:247—56.
 66. Woodbury D., Reynolds K., Black I.B. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J Neuroscience Res* 2002;69:908—17.