

УДК 576.5

# Экспансия гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток пуповинной крови *ex vivo*

Е. В. Сотнезова, Е. Р. Андреева, А. И. Григорьев, Л. Б. Буравкова\*

Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем РАН, 123007, Москва, Хорошевское шоссе, 76А

\*E-mail: buravkova@imbp.ru

Поступила в редакцию 10.02.2016

Принята к печати 30.03.2016

**РЕФЕРАТ** В настоящее время трансплантация клеток пуповинной крови активно применяется в клинической практике, однако существенным ее недостатком является ограниченное количество гемопоэтических стволовых клеток и длительное время восстановления пациентов после трансплантации. Увеличить количество гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток пуповинной крови можно путем экспансии *ex vivo* с использованием различных комбинаций цитокинов. Кроме этого, существуют методические подходы, обеспечивающие амплификацию клеток пуповинной крови *ex vivo* при взаимодействии с естественными для гемопоэтических клеток факторами микроокружения, в том числе со стромальным компонентом и тканевым содержанием кислорода. Развитие молекулярно-генетических методов анализа привело к расширению представлений о механизмах, опосредующих функционирование гемопоэтической ниши, что позволило разработать новые технологические приемы амплификации клеток пуповинной крови. С помощью таких подходов улучшен ряд важных клинических показателей восстановления кроветворения. Хорошие результаты получены при повышении эффективности трансплантации пуповинной крови путем создания оптимальных условий для хоминга и приживления клеток в костном мозге реципиента. В настоящем обзоре рассмотрены современные методические подходы, направленные на повышение эффективности применения гемопоэтических клеток пуповинной крови.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** гемопоэтические стволовые клетки, пуповинная кровь, экспансия клеток *ex vivo*.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ГСПК – гемопоэтические стволовые и прогениторные клетки; МСК – мезенхимальные стромальные клетки; КОЕ – колониеобразующие единицы; ПК – пуповинная кровь; G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор; GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; IL – интерлейкин; TGF- $\beta$  – трансформирующий фактор роста; dmPGE2 – 16,16-диметилпростагландин E2; SDF-1 – фактор стромальных клеток 1; CXCR4 – СХС-рецептор хемокинов типа 4; С3а – фрагмент системы комплемента 3а.

## ВВЕДЕНИЕ

В конце прошлого века пуповинная кровь (ПК) привлекла большой интерес ученых и врачей-трансфузиологов в связи с успешным использованием в качестве альтернативы гемопоэтическим клеткам костного мозга. В настоящее время ПК применяется не только для гематологических трансплантаций. Перечень заболеваний и патологий, при которых возможно использование ПК, с каждым годом увеличивается. Следует отметить, что ПК содержит клетки крови различной степени зрелости, включая дифференцированные форменные элементы и гемопоэтические стволовые и прогениторные клетки (ГСПК), а также другие типы клеток, в том числе недифференцированные соматические стволовые клетки [1–

5], мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) [6–9] и эндотелиальные прогениторные клетки [10].

Если рассматривать пуповинную кровь в качестве трансплантата кроветворной ткани, то бесспорным ее преимуществом является неинвазивный способ получения, доступность, безопасность для донора и меньшая по сравнению с костным мозгом или мобилизованной периферической кровью частота и тяжесть развития реакции «трансплантат против хозяина» [11–13]. Однако из-за небольшого содержания ГСПК ПК имеет и недостатки, связанные с медленным восстановлением кроветворения и иммунитета. ПК существенно отличается от костного мозга или мобилизованной периферической крови количе-

ством, составом и свойствами гемопоэтических клеток. ГСПК пуповинной крови, в отличие от костномозговых, находятся вне клеточного цикла, однако достаточно быстро дают сильный пролиферативный ответ на стимуляцию ростовыми факторами [14–17]. Способность ГСПК ПК к экспансии *ex vivo* в ответ на стимуляцию легла в основу разработки различных подходов к увеличению содержания кроветворных клеток в трансплантатах ПК.

Существуют две основные стратегии увеличения количества гемопоэтических клеток после выделения мононуклеарной фракции из ПК: одна из них основана на экспансии коммитированных гемопоэтических предшественников, а другая – на увеличении количества клеток с большим пролиферативным потенциалом – ГСПК [18]. В первом случае использование коммитированных клеток позволяет сократить период восстановления кроветворения после трансплантации, а во втором – пропадает необходимость введения дополнительной единицы ПК. Так, если использовать для трансплантации мононуклеарные клетки пуповинной крови после *ex vivo* наращивания коммитированных предшественников, то для долгосрочного восстановления кроветворения после аплазии костного мозга пациентам необходимо вводить дополнительную единицу ПК, не подвергшуюся каким-либо манипуляциям и содержащую ГСПК. Если в ходе *ex vivo* экспансии получены клетки, обладающие большим пролиферативным потенциалом и способные длительно поддерживать кроветворение (long-term repopulating cells), то дальнейшие манипуляции позволят получить как малодифференцированные клетки, так и коммитированные, что сможет гарантировать краткосрочное и длительное восстановление кроветворения после трансплантации. Такой подход позволит избежать введения дополнительной единицы ПК. Стоит отметить, что, помимо описанных, существуют другие стратегии повышения эффективности ПК, направленные не на экспансию, а на обеспечение действенного хоминга и приживления трансплантируемых клеток [19–25].

### ОСНОВНЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ЭКСПАНСИИ ГСПК ПУПОВИННОЙ КРОВИ *ex vivo*

При создании эффективных и контролируемых методических подходов, обеспечивающих получение большого количества ГСПК, основное внимание направлено на подбор компонентов ростовых сред и методов выделения малодифференцированных клеток. Между тем в большинстве существующих моделей культивирования ГСПК из ПК недооцененной остается роль локального микроокружения: взаимодействий со стромальными элементами, паракринной регуляции и концентрации кислорода (рис. 1).

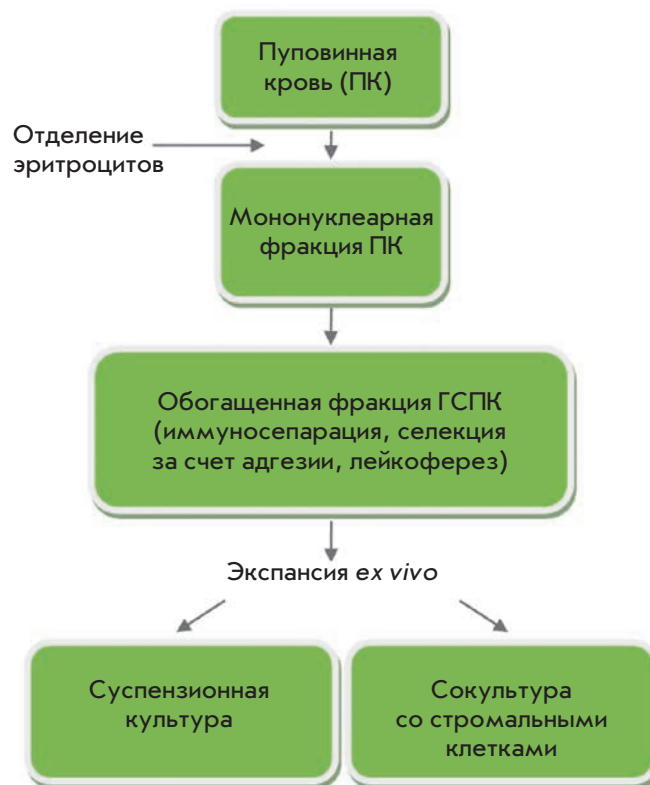


Рис. 1. Методические подходы к экспансии клеток пуповинной крови *ex vivo*

### Использование обогащенной фракции ПК

Выбор между использованием нефракционированного образца кроветворной ткани или проведением селекции – первая задача при подборе подхода к экспансии клеток пуповинной крови. Селекция проводится с помощью моноклональных антител к специфическим маркерам с магнитными или флуоресцентными метками. Возможна положительная селекция, когда из исходно гетерогенного материала выделяют определенные типы клеток, либо отрицательная, при которой происходит удаление нежелательных клеток непосредственно из суспензии. Показано, что с использованием обогащенной гемопоэтическими клетками фракции удастся добиться лучшего результата при экспансии *in vitro* [26].

Наиболее распространенные маркеры для позитивной селекции гемопоэтических стволовых клеток – CD34 и CD133, однако при их использовании из экспансии исключаются клетки, негативные по данным антигенам, но обладающие свойствами стволовых [27]. Присутствие тех или иных поверхностных маркеров не свидетельствует о физиологических особенностях клетки, будь то способность к самообновлению, пролиферации или дифферен-

цировке. Кроме того, экспрессия фенотипа не всегда может быть устойчивой. Так, Summers и соавт. показано, что популяция CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>-клеток пуповинной крови генерирует CD34<sup>+</sup>-ГСПК при культивировании с использованием стромальных клеток костного мозга мышей [28]. В данном подходе есть и другие недостатки: требуется большое количество исходных клеток, в процессе выделения часть гемопоэтических клеток теряется [29]. Отказ от предварительной процедуры иммуносепарации позволяет избежать возможного повреждения клеток при проведении большого количества лабораторных манипуляций (центрифугирование, ресуспендирование и др.), а также изменения функционального состояния клеток, опосредованного связыванием антител с поверхностными молекулами [30].

В настоящее время опубликованы работы, в которых для экспансии ГСПК используют нефракционированную ПК [31–33]. В то же время разработаны подходы, в которых часть одной единицы пуповинной крови вводят реципиенту без какой-либо обработки, а другую часть используют для экспансии с предварительным обогащением (CD34<sup>+</sup> или CD133<sup>+</sup> селекция). Таким образом, трансплантат сохраняет свой иммунологический потенциал, что увеличивает его приживание и иммунологическое восстановление [34, 35].

### Растворимые компоненты систем культивирования

Традиционным компонентом для культивирования большинства типов клеток человека, включая ГСПК, является фетальная телячья сыворотка (ФТС), содержащая природный коктейль факторов роста, медиаторов адгезии, минеральных веществ, липидов и гормонов. Однозначного мнения о возможности клинического применения клеток после их экспансии с использованием ФТС не существует. К недостаткам сыворотки можно отнести трудность стандартизации состава, возможность вирусной контаминации, а также высокий риск иммунизации реципиента чужеродными белками [36, 37]. В этой связи некоторые исследователи отказываются от ФТС в пользу цитокиновых коктейлей [26, 38]. Тем не менее следует учитывать, что в сыворотке присутствуют минорные компоненты, действие которых до сих пор не идентифицировано и не может быть полностью скомпенсировано бессывороточными средами.

В настоящее время известно большое количество растворимых факторов, влияющих на пролиферацию и дифференцировку ГСПК. Различные их комбинации могут определять сроки и степень экспансии культивируемых клеток. Клетки ПК так же, как клетки периферической крови, синтезируют цитокины. В частности, Т-клетки, ЕК-клетки и ма-

крофаги ПК продуцируют гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), макрофагальный колониестимулирующий фактор, интерлейкины 2, 3 и 4 (IL-2, -3, -4), трансформирующий фактор роста (TGF-β), интерферон-γ [39–41]. Однако количество синтезируемого медиатора, его биологическая активность и количество продуцирующих клеток в ПК значительно меньше, чем в периферической крови.

Несмотря на обилие рекомбинантных цитокинов, применяемых для экспансии малодифференцированных гемопоэтических предшественников, оптимальной комбинации, утвержденной для использования в клинической практике, пока не существует. Наиболее часто используются фактор стволовых клеток (SCF), IL-3 и -6, G-CSF, тромбопоэтин (TPO) и лиганд Flt-3 [42, 43].

Следует отметить, что важен не только выбор факторов, но также их концентрация и последовательность применения. Так, использование (в течение первых 3 дней) цитокинов SCF, IL-3, Flt-3, TPO и среды, содержащей 4% фетальной телячьей сыворотки для культивирования ГСПК, с последующим переводом клеток на среду, содержащую 20% фетальной телячьей сыворотки и макрофагальный колониестимулирующий фактор, Flt-3, IL-3, SCF, способствует экспансии CD34<sup>+</sup> клеток [43]. Факторы роста SCF, Flt-3, IL-11, IL-3, IL-6, GM-CSF отвечают за пролиферацию клеток, в то время как макрофагальный колониестимулирующий фактор, G-CSF, эритропоэтин (EPO) и TPO отвечают за дифференцировку и созревание клеток. Цитокины SCF, IL-3 и IL-6 действуют в фазе G0/G1 клеточного цикла и, работая вместе, индуцируют митоз [44].

Тем не менее для экспансии гемопоэтических клеток применяют и другие комбинации цитокинов. Naylock и соавт. показали, что при использовании сочетания IL-1β, IL-3, IL-6, G-CSF, GM-CSF и SCF степень экспансии выше, чем при использовании комбинаций, в которых не хватает какого-либо из этих шести цитокинов [45].

Стоит отметить, что существуют факторы, присутствие которых в среде культивирования уменьшает степень экспансии гемопоэтических клеток. Показано, что IL-8, тромбоцитарный фактор-4, индуцируемый IFN-γ белок и моноцитарный хемотаксический фактор-1 *in vitro* снижают пролиферацию колониеобразующих единиц гранулоцитов, эритроцитов, моноцитов и мегакариоцитов (КОЕ-ГЭММ), гранулоцитов и моноцитов (КОЕ-ГМ) и бурстобразующих единиц эритроцитов (БОЕ-Э), стимулированных ростовыми факторами [46, 47], а макрофагальный белок воспаления α подавляет пролиферацию

стволовых клеток мышей, соответствующих КОЕ-С 12 (колониеобразующие единицы селезенки, дающие начало гранулоцитарным, моноцитарным, эритроидным, мегакариоцитарным и лимфоидным колониям на 12-е сутки после трансплантации облученным животным), и более ранних клеток КОЕ-Бл (клетки, образующие в культуре колонии бластных клеток) у мышей в системе *ex vivo* [48].

При культивировании с использованием только растворимых факторов гемопоэтические клетки лишаются поддерживающего влияния микроокружения: межклеточных взаимодействий с негемопоэтическими клетками, компонентов тканевого матрикса и паракринных медиаторов. С другой стороны, добавление в среду экзогенных цитокинов при использовании фидерных клеток, продуцирующих SCF и IL-6, а также многие другие паракринные факторы, способствует поддержанию гемопоэтических предшественников, но не является строго обязательным.

### **МОДЕЛИРОВАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ ДЛЯ ЭКСПАНСИИ ГСПК *ex vivo***

Справедливости ради стоит сказать, что первые этапы изучения гемопоэтических стволовых клеток взрослого организма были связаны с созданием естественного микроокружения [49, 50]. Так, начальные попытки культивирования суспензионных гемопоэтических культур показывали быстрое угасание гемопоэза и замещение гемопоэтических клеток макрофагами. Использование системы культивирования, содержащей подложку из клеток костного мозга, позволило получить культуру, содержащую кроветворные предшественники, обладающие свойствами гемопоэтических стволовых клеток интактного костного мозга [49]. Дальнейшие исследования были направлены на создание различных модификаций и усовершенствований данной системы культивирования.

### **Сокультивирование со стромальными клетками**

Сокультивирование со стромальными фидерными клетками представляет собой более физиологичную альтернативу использованию рекомбинантных цитокинов, которое применялось с самого начала изучения костномозговых гемопоэтических клеток [49]. В настоящее время активно проводится поиск новых линий клеток, поддерживающих экспансию *in vitro* ГСПК при сокультивировании [51]. Совместное культивирование гемопоэтических предшественников с различными типами клеток, проявляющих фидерные свойства по отношению к ним, не только применимо для экспансии малодифференцированных предшественников в целях их клинического ис-

пользования, но также позволяет исследовать взаимоотношения клеток в пределах кроветворной ниши.

Традиционным и наиболее практичным подходом является использование мезенхимальных стромальных клеток в качестве фидерного подслоя для экспансии ГСПК *in vitro* [52–59]. Помимо того, что МСК проявляют фидерные свойства по отношению к гемопоэтическим клеткам, они обладают высокой пролиферативной активностью, а также более доступны, чем иные типы фидерных клеток человека (например, дуктальные эпителиоциты или спленоциты) [60]. Показано, что стромальные клетки костного мозга в Dexter-культурах могут поддерживать кроветворение *in vitro* более 6 месяцев [49]. Некоторые исследователи используют МСК после направленной дифференцировки в остеобласты, создавая таким образом подобие эндостальной ниши [61].

МСК и более дифференцированные стромальные клетки секретируют различные цитокины [62–64]. Практически все данные о продукции цитокинов МСК человека получены на культуре клеток, поэтому о том, как каждый цитокин вовлечен в паракринную регуляцию *in vivo*, с уверенностью сказать нельзя. Тем не менее показано, что МСК продуцируют большое количество цитокинов, поддерживающих ГСПК в состоянии покоя или способствующих их самообновлению, в частности SCF, фактор, ингибирующий лейкозные клетки, фактор стромальных клеток 1 (SDF-1), онкостатин М, морфогенетический белок кости-4, лиганд Flt-3, TGF- $\beta$ , IL-1, -6, -7, -8, -11, -12, -14, -15 [62, 63]. Кроме того, при добавлении в среду культивирования IL-1 $\alpha$  МСК могут продуцировать такие факторы роста, как GM-CSF и G-CSF, влияющие на более зрелые гемопоэтические предшественники, что свидетельствует о взаимной регуляции МСК и гемопоэтических клеток [65–67].

Исследователи, моделируя *in vitro* условия костномозговой ниши, используют МСК из различных источников [52, 54, 68]. Наиболее часто используемыми и поэтому хорошо охарактеризованными являются МСК из костного мозга. МСК получены также из стенки сосудов, синовиальной мембраны, плаценты, пуповинной крови, субэндотелиального слоя пупочной вены. Между МСК из различных источников существуют некоторые отличия, касающиеся экспрессии ряда маркеров, способности к пролиферации и дифференцировке, но в целом их характеристики сходны [69–72]. Известно, что МСК из стромально-вазкулярной фракции жировой ткани человека способны поддерживать гемопоэз *in vitro* [53, 73]. Поэтому они представляют хорошую альтернативу МСК из костного мозга и легкодоступный источник фидерных клеток для экспансии ГСПК ПК с целью широкомасштабного клинического использования [74].

McNiese и соавт. разработали протокол культивирования ГСПК, согласно которому 14-дневная экспансия клеток ПК обеспечивается совместным их культивированием с МСК из костного мозга в присутствии гемопоэтических цитокинов в течение 7 дней, а также культивированием в течение 7 дней в присутствии только цитокинов [52]. С помощью данной методики удалось существенно сократить время восстановления нейтрофилов и тромбоцитов после трансплантации двух единиц ПК, одна из которых была обогащена ГСПК с использованием описанного протокола. Таким образом, применение фидерных слоев для экспансии ГСПК ПК позволяет ограничить использование экзогенных факторов роста без снижения эффективности амплификации клеток.

### Тканевое содержание кислорода

Содержание кислорода – один из основных неклочечных факторов кроветворного микроокружения, участвующих в регуляции развития гемопоэтических клеток. В костном мозге содержание кислорода варьирует от 1 до 6%, при этом в области гипоксии находятся покоящиеся ГСПК, тогда как в местах с более высоким содержанием кислорода – пролиферирующие ГСПК [75]. Низкое парциальное давление кислорода играет важную роль в поддержании тех или иных физиологических свойств гемопоэтических клеток, что существенно при изучении взаимодействия гемопоэтических и стромальных клеток *in vitro*, а также должно обязательно учитываться при разработке протоколов амплификации клеток ПК [76, 77].

Известно, что пониженное содержание кислорода оказывает значительное влияние на гемопоэтические клетки *in vitro*, их способность к колониеобразованию, устойчивость к облучению и потенциал к восстановлению гемопоэза у летально облученных животных [75, 78]. Кроме того, низкое парциальное давление кислорода способствует преимущественному поддержанию жизнеспособности и пролиферации малодифференцированных гемопоэтических клеток по сравнению с коммитированными предшественниками [78, 79].

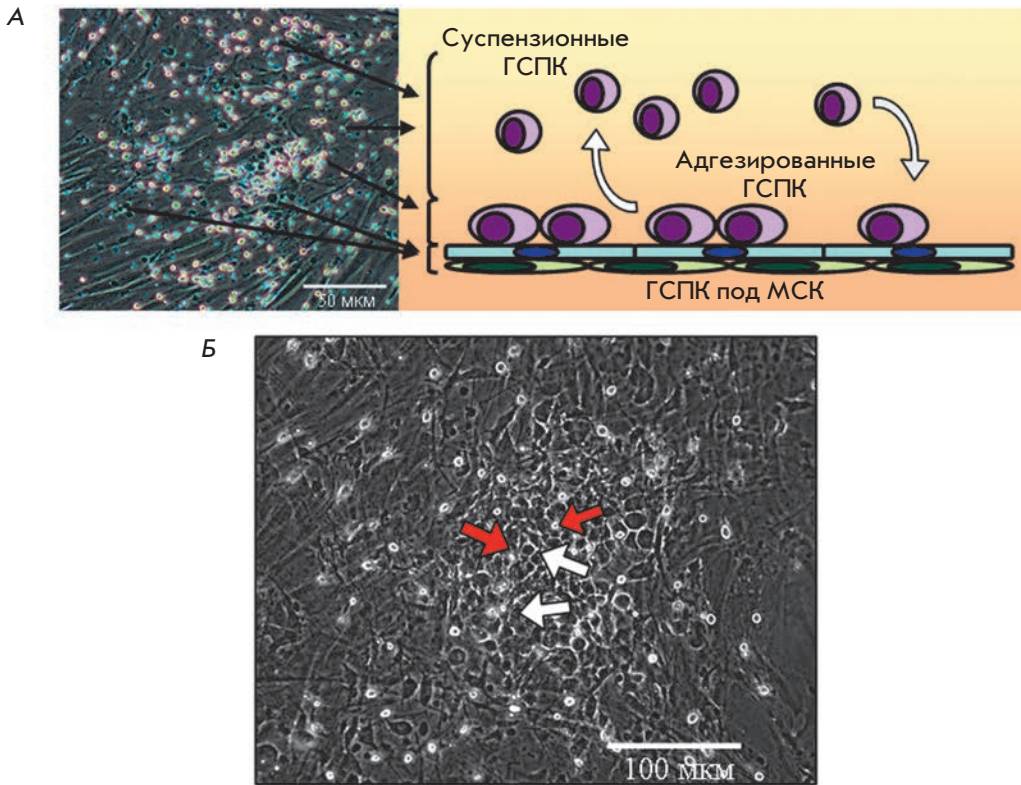
Интересно, что варьирование содержания кислорода в сочетании с различными комбинациями цитокинов позволяет амплифицировать клетки ПК с различными свойствами. Так, группой исследователей под руководством Ivanovic было показано, что при 3% кислорода в присутствии SCF, G-CSF, TPO и IL-3 обеспечивается одновременно поддержание примитивных гемопоэтических клеток, способных восстанавливать кроветворение у облученных животных при трансплантации, и экспансию коммитированных предшественников (КОЕ) [80]. Показано

также, что культивирование обогащенной CD133<sup>+</sup> клетками фракции ПК с добавлением рекомбинантных цитокинов SCF, Flt-3, TPO, IL-6, IL-3 в присутствии 5% кислорода позволяет увеличить количество CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> клеток почти в 27 раз (независимо от присутствия сыворотки в среде), что значительно ( $P < 0.01$ ) выше, чем при стандартном содержании кислорода [81]. Среди клеток, амплифицированных в условиях пониженного содержания кислорода, было больше КОЕ с миелоидным потенциалом, а также выше способность к восстановлению гемопоэза при трансплантации облученным животным. Показано, что пониженное содержание кислорода индуцирует в гемопоэтических клетках экспрессию генов *HIF-1α*, *VEGF* и *ABCG2*, а также активирует экспрессию CXС рецептора хемокинов 4 (CXCR4) [82].

В работе Tursky и соавт. культивирование клеток ПК при 10% кислорода с добавлением цитокинов (TPO, SCF, Flt-3 лиганда и IL-6) приводило к большей экспансии ГСПК, чем при использовании наиболее распространенного протокола культивирования клеток ПК (20% кислорода, TPO, SCF и G-CSF) [42].

С зависимостью от содержания кислорода связана одна важная особенность гемопоэтических клеток – занимать определенные «ниши» при совместном культивировании со стромальными клетками. Еще в 1977 году в работах Dexter и соавт. было описано распределение гемопоэтических клеток в таких сокультурах: часть гемопоэтических предшественников находится в суспензии над подслоем, часть адгезирует к поверхности подслоя, а некоторые клетки мигрируют в субстромальное пространство (рис. 2А) [49]. При длительном сокультивировании образуются участки активной пролиферации гемопоэтических клеток (так называемых областей «булыжной мостовой»), которые обнаруживаются с помощью фазово-контрастной микроскопии и визуально представляют плотные скопления клеток, располагающиеся под слоем МСК (рис. 2Б) [82].

Пространственная организация гемопоэтических клеток в совместной культуре сопоставима с их распределением в костном мозге: клетки в зависимости от состояния покоя/активной пролиферации располагаются в областях с различным содержанием кислорода и доступностью питательных веществ. Так, фракция клеток, адгезирующих на поверхность МСК, содержала наибольшую долю активно пролиферирующих клеток. По сравнению с другими фракциями гемопоэтических предшественников в сокультуре клетки, мигрировавшие под стромальный монослой, делятся редко и сохраняют незрелый фенотип CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> [83]. Учитывая особенность гемопоэтических клеток занимать определенное по-



**Рис. 2.** Культивирование мононуклеарных клеток пуповинной крови на подслое МСК. А – характерный вид сокультуры и графическое представление распределения в ней гемопоэтических клеток. Б – области «бульжистой мостовой». Белыми стрелками отмечены ГСПК, адгезированные к поверхности МСК, красными стрелками – ГСПК, лежащие под МСК

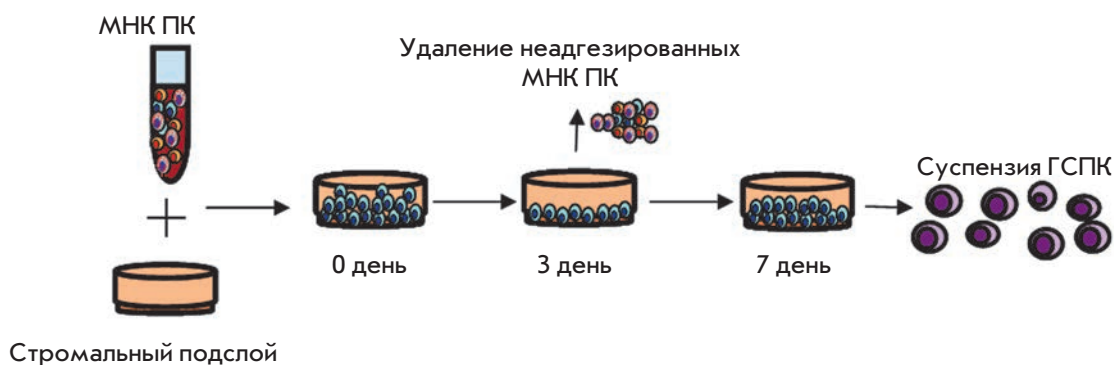
ложение в сокультуре в зависимости от пролиферативного потенциала, можно фракционировать клетки по их способности к адгезии и выделять популяции клеток с определенными свойствами (рис. 3) [73].

Согласно Jing и соавт., при культивировании в условиях атмосферного содержания кислорода наиболее «гипоксические» гемопоэтические клетки располагались под монослоем стромальных клеток [83]. При пониженном содержании кислорода уменьшалась адгезия гемопоэтических клеток к стромальным клеткам, однако такие условия способствовали миграции клеток под монослой. В условиях гипоксии усиливалась продукция фактора роста эндотелия сосудов А, который, по-видимому, опосредовал увеличение проницаемости монослоя МСК. Стоит отметить, что пониженное содержание кислорода влияет как на гемопоэтические и стромальные клетки, так и на их взаимодействие [83].

Воссоздавая микроокружение костного мозга *ex vivo*, используют кислород, содержание которого соответствует тканевому, а в качестве клеточного компонента микроокружения – различные фидерные слои, в частности МСК [76, 77]. Однако стоит учитывать, что пониженное содержание кислорода в среде культивирования влияет не только на гемопоэтические клетки, но и на МСК. Определение дифференцировочного потенциала этих клеток *in*

*vitro* в условиях гипоксии выявило снижение остеогенного и адипогенного потенциала [84, 85]. Кроме того, пониженное содержание кислорода при культивировании усиливает дифференцировку в хондрогенном направлении, а также увеличивает пролиферативную активность и число колониеобразующих единиц фибробластов [84, 86, 87]. Эти данные подчеркивают роль кислорода как важного фактора, определяющего судьбу клеток, относящихся к стромальному и гемопоэтическому гистогенетическому ряду. Используя МСК в качестве фидерного подслоя для культивирования гемопоэтических клеток, важно учитывать влияние содержания кислорода на продукцию биологически активных медиаторов МСК. Установлено, что в присутствии 4–5% кислорода возрастает продукция МСК таких медиаторов, как IL-1 $\beta$ , IL-10, фактор роста гепатоцитов, фактор роста эндотелия сосудов, основной фактор роста фибробластов, TGF- $\beta$ , GM-CSF, однако снижается образование фактора некроза опухолей  $\alpha$  [64, 88].

Koller и соавт. для экспансии гемопоэтических клеток пуповинной крови *in vitro* использовали методический подход, учитывающий влияние совокупности факторов кровяного микроокружения [89]. Клетки ПК культивировали с добавлением или отсутствием рекомбинантных цитокинов и подслоя



**Рис. 3.** Схема культивирования мононуклеарных клеток пуповинной крови (МНК ПК) на стромальном подслое, в котором адгезирующая к МСК фракция МНК ПК способна генерировать популяцию клеток, обогащенную гемопоэтическими предшественниками [73]

МСК, при 5 или 20% кислорода. Установлено, что использование IL-3/IL-6 обеспечивает более эффективную экспансию гемопоэтических предшественников, поддерживаемую в культуре более 8 недель, чем IL-1/IL-3. Этот эффект усиливался при культивировании в условиях пониженного содержания кислорода. Присутствие слоя облученных стромальных клеток не оказывало значительного эффекта на экспансию гемопоэтических клеток при добавлении цитокинов, особенно при низком содержании кислорода.

В зависимости от содержания кислорода в среде культивирования эффект, оказываемый на гемопоэтические клетки, может быть различным. Совместное культивирование мононуклеаров пуповинной крови и МСК из костного мозга в условиях 2% O<sub>2</sub> способствует значительно более низкой продукции CD34<sup>+</sup> клеток (25-кратное увеличение против 60-, 64- и 92-кратного на 10 день при 5, 21, 10% O<sub>2</sub> соответственно). Определение динамики роста выявило более высокий пролиферативный статус клеток ПК, культивируемых при 5, 10, 21% кислорода, чем при 2% O<sub>2</sub> [90].

Таким образом, для создания эффективных и контролируемых методических подходов, обеспечивающих получение большого количества гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток для трансплантации, необходимо учитывать особенности микроокружения кроветворной ниши, в том числе содержание кислорода.

### **МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ЭКСПАНСИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ И ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ *ex vivo***

Наиболее распространенные подходы к экспансии клеток ПК основаны на данных, полученных в ходе

изучения влияния клеточных и неклеточных факторов кроветворного микроокружения на ГСПК, включая тканевое содержание кислорода, взаимодействие со стромальными клетками и паракринные медиаторы. Однако, благодаря развитию молекулярно-генетических методов, представления о механизмах, опосредующих работу гемопоэтической ниши, значительно расширились, что позволило создать новые технологические подходы к амплификации ГСПК ПК.

### **Экспансия, опосредованная Notch**

Известно, что семейство рецепторов и лигандов Notch участвует в многочисленных процессах [91–93]. Рецептор Notch 1 обнаружен на CD34<sup>+</sup> гемопоэтических предшественниках [94]. Кроме того, активация сигнализации Notch способствует сохранению фенотипа самых примитивных гемопоэтических стволовых клеток *in vitro*. Это привело к созданию бессывороточной системы культивирования CD34<sup>+</sup> гемопоэтических клеток, состоящей из иммобилизованного Delta1 Notch-лиганда и ранних цитокинов гемопоэтических стволовых клеток (SCF, TPO, Flt-3 лиганд, IL-3 и IL-6) [95]. Неоднозначные результаты получены при трансплантации двух единиц ПК, одна из которых была обогащена ГСПК с применением Notch-системы, проведенной в ходе клинических испытаний. Использование Notch-трансплантата позволяло сократить время восстановления нейтрофилов, однако по истечении 3 месяцев кроветворение у реципиентов обеспечивалось другим трансплантатом ПК. Наблюдаемый эффект можно объяснить двумя обстоятельствами: потерей за время культивирования клеток, обеспечивающих долгосрочное восстановление гемопоэза (long-term repopulating cells); иммунным ответом Т-клеток неманипулированного трансплантата ПК [34, 35].

### Экспансия в присутствии StemEx (хелатора меди)

У пациентов с дефицитом меди значительно снижен гранулоцитопоз и эритропоз, при этом в биоптатах костного мозга у них выявлено снижение числа зрелых гранулоцитов и увеличение числа промиелоцитов и миелоцитов по сравнению с людьми без этого дефицита [96, 97]. Данное наблюдение позволило предположить, что дефицит меди влияет на дифференцировку миелоидных предшественников. Позднее был разработан компонент культуральной системы StemEx, действие которого основано на влиянии низких концентраций меди на дифференцировку гемопоэтических стволовых клеток в системе *in vitro*. В StemEx медный хелатор тетраэтиленпентамин сочетается с ранними и поздними гемопоэтическими цитокинами [98, 99]. Применение технологии StemEx предполагает проведение экспансии в присутствии StemEx части клеток из одной единицы ПК в течение 21 дня. Другую часть ПК вводят в исходном виде совместно с клетками, амплифицированными в присутствии StemEx [100]. Использование такого подхода приводит к улучшению ряда важных клинических показателей по сравнению с применением ПК в исходном виде, что свидетельствует об эффективности данной системы культивирования для амплификации ГСПК ПК *ex vivo* [101].

### Экспансия NiCord

Технология NiCord основана на действии эпигенетического фактора – никотинамида, который позволяет замедлить дифференцировку и увеличить функциональность гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток, полученных в ходе *ex vivo* экспансии. Добавление никотинамида вместе с гемопоэтическими цитокинами в культуру способствует увеличению доли CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> примитивных клеток и усиливает миграцию в направлении к SDF-1 *in vitro*. Кроме того, показана высокая эффективность приживления амплифицированных клеток в моделях *in vivo* [102]. NiCord не только позволяет увеличить количество ГСПК в сравнении с представленными выше технологиями, но и обеспечивает эффективное приживание клеток. Уникальной особенностью NiCord-трансплантата является то, что вместе с фракцией ГСПК, полученной после 21-дневной экспансии, он содержит фракцию некультивированных Т-клеток, которую собирают и повторно замораживают после разморозки. Таким образом, NiCord-трансплантат сохраняет иммунологический потенциал, что улучшает приживание трансплантата и иммунологическое восстановление. Результаты клинического применения ГСПК, амплифицированных в соответствии с протоколом NiCord и трансплантированных вместе с дополнительной единицей ПК, свидетельствуют

о более раннем восстановлении нейтрофилов (медиана 11 дней против 25 дней,  $P = 0.001$ ) и тромбоцитов (30 дней против 41,  $P = 0.012$ ) по сравнению с контролем [103]. Это исследование подтверждает присутствие долгосрочных (long-term repopulating cells) и краткосрочных репопулирующих клеток в трансплантате пуповинной крови после NiCord-экспансии.

### Экспансия в присутствии Stem-Regenin 1

Stem-Regenin 1 – пуриновое производное, способствующее экспансии *ex vivo* ГСПК [104]. В технологии Stem-Regenin 1 для инициирования клеточной культуры используется фракционированная популяция CD34<sup>+</sup> клеток ПК. Показано, что во время 3-недельного культивирования в среде без сыворотки, содержащей Stem-Regenin 1 и дополнительно TPO, SCF, лиганд Flt-3 и IL-6, происходит 1118-кратная экспансия CD34<sup>+</sup> клеток относительно исходной популяции. Удаление из системы культивирования Stem-Regenin 1 приводит к быстрой дифференцировке, что указывает на важную роль этого компонента в поддержании малодифференцированного состояния гемопоэтических предшественников ПК. Клетки, полученные с применением Stem-Regenin 1, способны к высокоэффективному приживлению после трансплантации мышам с иммунодефицитом, что свидетельствует о присутствии среди них гемопоэтических предшественников, обеспечивающих раннее и устойчивое восстановление гемопоэза. Эта технология хорошо проявила себя в клинических испытаниях и в настоящее время продолжает активно изучаться [105].

### СТРАТЕГИИ, НАПРАВЛЕННЫЕ НА ПОВЫШЕНИЕ ХОМИНГА ГСПК

Разработаны также методические подходы, направленные на увеличение хоминга и приживание потенциальных стволовых клеток ПК без экспансии. Они представляют недорогую и безопасную альтернативу экспансии ГСПК *ex vivo*.

### Сокультивирование с простагландином E2

Изучение гемопоэза рыб *Danio rerio* выявило участие dmPGE2 (16,16-диметилпростагландин E2) в гомеостазе гемопоэтических стволовых клеток [22]. Это позволило предположить, что короткая экспозиция *ex vivo* клеток ПК с dmPGE2 позволит увеличить «эффективную дозу» гемопоэтических стволовых клеток без значительной токсичности для пациента. Показано, что краткосрочная инкубация ГСПК с dmPGE2 способствует увеличению их количества после трансплантации и обеспечивает преимущество этих клеток при серийной трансплантации с полным мультилинейным восстановлением костного мозга



у мышей [106]. Обнадеживающие результаты получены при клиническом использовании dmPGE<sub>2</sub>, и методика применения dmPGE<sub>2</sub> в настоящий момент продолжает активно разрабатываться [24].

### Фукозилирование

Данный подход направлен на увеличение хоминга стволовых клеток ПК к строме костного мозга. Методика основана на том, что гемопоэтические стволовые клетки ПК не мигрируют в костный мозг столь же активно, как клетки взрослого костного мозга или мобилизованные клетки периферической крови. Снижение эффективности хоминга в костном мозге может частично возникать из-за отсутствия связи с молекулами адгезии (P- и E-селектинами), которые экспрессируются на эндотелиальных клетках в сосудах костного мозга [19]. Фукозилирование лигандов селектина, экспрессирующихся на стволовых клетках ПК, увеличивает сродство к P- и E-селектинам гемопоэтического микроциркуляторного русла и критично для обеспечения «роллинга» ГСПК [107]. Достаточно простая процедура фукозилирования представляет собой инкубацию клеток ПК с фукозилтрансферазой IV и ее субстратом GDP-фукозой в течение 30 мин при комнатной температуре. На моделях *in vivo* показано повышение эффективности приживления стволовых клеток ПК с использованием предтрансплантационного *ex vivo* фукозилирования у мышей с иммунодефицитом [25, 108].

### Взаимодействие CXCR4–SDF-1

SDF-1 и его рецептор CXCR4 также обеспечивают хоминг ГСПК и удерживание их в костном мозге. CXCR4 экспрессируется на ряде клеток, включая МСК, эндотелиальные клетки и различные субпопуляции гемопоэтических клеток, в том числе ГСПК. SDF-1 является мощным хемоаттрактантом для CD34<sup>+</sup> ГСПК, которые после трансплантации мигрируют в костный мозг по градиенту SDF-1 [109–113]. Оптимальная экспрессия CXCR4 в ГСПК и эффективный уровень SDF-1 в костном мозге реципиента обеспечивают приживление трансплантата. Негативным регулятором данного взаимодействия является дипептидилпептидаза-4 (DPP4), способная удалить N-концевой дипептид из SDF-1, снижая, тем самым, его активность и способность к взаимодействию с рецептором. Ингибирование этого фермента привело к 2–3-кратному увеличению хоминга CD34<sup>+</sup> и Lin<sup>-</sup>клеток человека при трансплантации мышам NOD/SCID/B2m<sup>null</sup> [114]. Кроме того, известно, что дипептидилпептидаза-4 регулирует работу гемопоэтических факторов роста. Таким образом, ингибирование этого фермента благоприятно сказывается не только на хоминге, но и на росте клеток,

опосредованном действием ростовых факторов [115]. Использование препаратов, ингибирующих дипептидилпептидазу-4, дало обнадеживающие результаты по приживлению ПК трансплантатов [116]. Дальнейшие исследования направлены на определение оптимальной дозировки и сроков использования этих препаратов.

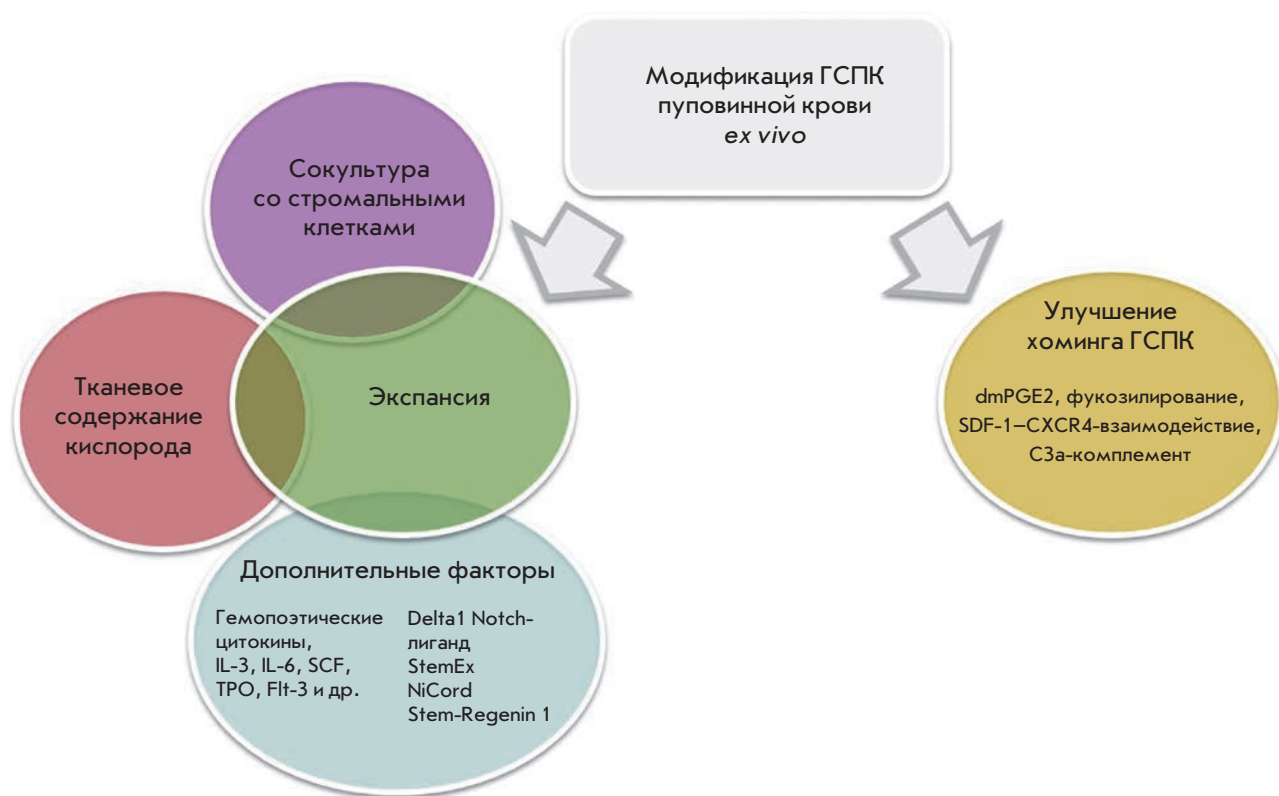
### Компонент С3а-комплемента

Компонент системы комплемента 3а (С3а) – продукт протеолитического расщепления белка комплемента С3. Наряду с многочисленными иммунорегуляторными свойствами, С3а сенсibiliзирует гемопоэтические стволовые и прогениторные клетки человека к хомингу в направлении к SDF-1 через связывание С3а с рецептором CXCR4. С3а наряду с DPP4, а также с гиалуриновой кислотой, фибронектином и фибриногеном регулирует экспрессию SDF-1 на ГСПК [117, 118]. Доклинические исследования показали, что инкубация гемопоэтических стволовых клеток с С3а до трансплантации летально облученным мышам ускоряет динамику приживления [20, 21]. Однако результаты клинического применения были не такими успешными, так как С3а не давал преимущества в приживлении трансплантата [23].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на многочисленные исследования, направленные на оптимизацию методических подходов к обогащению стволовыми клетками кроветворных трансплантатов, единой оптимальной технологии получения амплифицированных стволовых клеток до сих пор не существует. Основные задачи, стоящие перед исследователями на сегодняшний день, – сформировать представление о составе и биологических свойствах гемопоэтических клеток кроветворного трансплантата, обеспечивающих восстановление гемопоэза реципиента, и разработать методические подходы, обеспечивающие амплификацию этих клеток.

Сравнительный анализ материалов, накопленных в этой области, обнаруживает две тенденции: использование в системах для амплификации клеток пуповинной крови стромальных фидерных слоев или применение различных комбинаций гемопоэтических цитокинов. Между тем, в суспензионных культурах, в которых поддержание гемопоэтических предшественников происходит только за счет гемопоэтинов, не учитывается роль локального микроокружения (взаимодействие с клетками стромы и регуляция кислородом), тогда как показано, что эти факторы могут играть ключевую роль в развитии клеток крови. Экспансия ГСПК ПК более эффективна в сокультуре, чем в суспензионной культуре. Кроме



**Рис. 4.** Современные технологические подходы к модификации гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток пуповинной крови *ex vivo*

того, сокультивирование улучшает приживание амплифицированных клеток после трансплантации. Добавление к системе сокультивирования экзогенных цитокинов дополнительно поддерживает экспансию ГСПК. Таким образом, представляется целесообразным использовать для амплификации системы *ex vivo*, включающие как стромальный подслон и физиологический уровень кислорода, так и необходимый коктейль из цитокинов и факторов роста.

В настоящий момент достаточно успешно показали себя молекулярно-генетические подходы, направленные как на амплификацию гемопоэтических клеток, так и на улучшение хоминга транспланти-

руемых клеток в костном мозге реципиента (рис. 4). Таким образом, системы *ex vivo* для амплификации ГСПК уже разработаны и успешно применяются, однако продолжается поиск новых эффективных методических подходов к экспансии клеток ПК с привлечением современных клеточных и молекулярно-биологических технологий. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий».*

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Kögler G., Radke T.F., Lefort A., Sensken S., Fischer J., Sorg R.V., Wernet P. // *Exp. Hematol.* 2005. V. 33. № 5. P. 573–583.
2. Kögler G., Sensken S., Airey J.A., Trapp T., Müschen M., Feldhahn N., Liedtke S., Sorg R.V., Fischer J., Rosenbaum C., et al. // *J. Exp. Med.* 2004. V. 200. № 2. P. 123–135.
3. Kögler G., Sensken S., Wernet P. // *Exp. Hematol.* 2006. V. 34. № 11. P. 1589–1595.
4. Sensken S., Waclawczyk S., Knaupp A.S., Trapp T., Enczmann J., Wernet P., Kogler G. // *Cytotherapy.* 2007. V. 9. № 4. P. 362–378.
5. Greschat S., Schira J., Küry P., Rosenbaum C., de Souza Silva M.A., Kögler G., Wernet P., Müller H.W. // *Stem Cells Dev.* 2008. V. 17. № 2. P. 221–232.
6. Мусина Р.А., Бекчанова Е.С., Белявский А.В., Гриненко Т.С., Сухих Г.Т. // *Клет. технологии в биологии и медицине.* 2007. № 1. С. 16–20.

7. Erices A., Conget P., Minguell J.J. // *Br. J. Haematol.* 2000. V. 109. № 1. P. 235–242.
8. Bieback K., Kern S., Klüter H., Eichler H. // *Stem Cells.* 2004. V. 22. № 4. P. 625–634.
9. Yang S.E., Ha C.W., Jung M., Jin H.J., Lee M., Song H., Choi S., Oh W., Yang Y.S. // *Cytotherapy.* 2004. V. 6. № 5. P. 476–486.
10. Yoder M.C., Mead L.E., Prater D., Krier T.R., Mroueh K.N., Li F., Krasich R., Temm C.J., Prchal J.T., Ingram D.A. // *Blood.* 2007. V. 109. № 5. P. 1801–1809.
11. Cutler C., Antin J.H. // *Stem Cells.* 2001. V. 19. № 2. P. 108–117.
12. Gluckman E., Rocha V. // *Haematologica.* 2009. V. 94. № 4. P. 451–454.
13. Семенова Ж.Б., Сушкевич Г.Н., Карасева О.В., Ахатов Т.А., Семенова Н.А., Семенова Н.Ю., Сорокина Е.Г., Фуфаева Е.В., Романов Ю.А., Рошаль Л.М. и др. // *Нейрохирургия и неврология детского возраста.* 2011. № 1. С. 70–82.
14. Broxmeyer H.E., Hangoc G., Cooper S., Ribeiro R.C., Graves V., Yoder M., Wagner J., Vadhan-Raj S., Benninger L., Rubinstein P., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. V. 89. № 9. P. 4109–4113.
15. Lu L., Xiao M., Shen R.N., Grigsby S., Broxmeyer H.E. // *Blood.* 1993. V. 81. № 1. P. 41–48.
16. Moore M.A., Hoskins I. // *Blood Cells.* 1994. V. 20. № 2–3. P. 468–479; discussion P. 479–481.
17. Movassagh M., Caillot L., Baillou C., Guigon M., Lemoine F.M. // *Stem Cells.* 1997. V. 15. № 3. P. 214–222.
18. Horwitz M.E., Frassoni F. // *Cytotherapy.* 2015. V. 17. № 6. P. 730–738.
19. Hidalgo A., Weiss L.A., Frenette P.S. // *J. Clin. Invest.* 2002. V. 110. № 4. P. 559–569.
20. Reza R., Mastellos D., Majka M., Marquez L., Ratajczak J., Franchini S., Glodek A., Honczarenko M., Spruce L.A., Janowska-Wieczorek A., et al. // *Blood.* 2003. V. 101. № 10. P. 3784–3793.
21. Ratajczak J., Reza R., Kucia M., Majka M., Allendorf D.J., Baran J.T., Janowska-Wieczorek A., Wetsel R.A., Ross G.D., Ratajczak M.Z. // *Blood.* 2004. V. 103. № 6. P. 2071–2078.
22. North T.E., Goessling W., Walkley C.R., Lengerke C., Kopani K.R., Lord A.M., Weber G.J., Bowman T.V., Jang I.H., Grosser T., et al. // *Nature.* 2007. V. 447. № 7147. P. 1007–1011.
23. Brunstein C.G., McKenna D.H., DeFor T.E., Sumstad D., Paul P., Weisdorf D.J., Ratajczak M., Laughlin M.J., Wagner J.E. // *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2013. V. 19. № 10. P. 1474–1479.
24. Cutler C., Multani P., Robbins D., Kim H.T., Le T., Hoggatt J., Pelus L.M., Despons C., Chen Y.B., Rezner B., et al. // *Blood.* 2013. V. 122. № 17. P. 3074–3081.
25. Robinson S.N., Thomas M.W., Simmons P.J., Lu J., Yang H., Parmar S., Liu X., Shah N., Martín-Antonio B., Bollard C., Dotti G., et al. // *Cytotherapy.* 2014. V. 16. № 1. P. 84–89.
26. Briddell R.A., Kern B.P., Zilm K.L., Stoney G.B., McNiece I.K. // *J. Hematother.* 1997. V. 6. № 2. P. 145–150.
27. Уфимцева А.И., Канов Е.В. // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* 2012. Т. 6. № 4. С. 21–27.
28. Summers Y.J., Heyworth C.M., de Wynter E.A., Chang J., Testa N.G. // *Stem Cells.* 2001. V. 19. № 6. P. 505–513.
29. Koller M.R., Manchel I., Newsom B.S., Palsson M.A., Palsson B.O. // *J. Hematother.* 1995. V. 4. № 3. P. 159–169.
30. Gilner J.B., Walton W.G., Gush K., Kirby S.L. // *Stem Cells.* 2007. V. 25. № 2. P. 279–288.
31. de Lima M., McNiece I., Robinson S.N., Munsell M., Eapen M., Horowitz M., Alousi A., Saliba R., McMannis J.D., Kaur I., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2012. V. 367. № 24. P. 2305–2315.
32. Mantel C.R., O'Leary H.A., Chitteti B.R., Huang X., Cooper S., Hangoc G., Brustovetsky N., Srour E.F., Lee M.R., Messina-Graham S., et al. // *Cell.* 2015. V. 161. № 7. P. 1553–1565.
33. Aliyari Z., Khaziri N., Brazvan B., Saayah Melli M., Tayefi Nasrabadi H., Akbarzadeh A., Nozad Charoudeh H. // *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2015. Jun 4. P. 1–8.
34. Gutman J.A., Turtle C.J., Manley T.J., Heimfeld S., Bernstein I.D., Riddell S.R., Delaney C. // *Blood.* 2010. V. 115. № 4. P. 757–765.
35. Moretta A., Andriolo G., Lisini D., Martinetti M., Pasi A., Re-bulla P., Soligo D., Giordano R., Lazzari L., Maccario R. // *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2012. V. 18. № 7. P. 1108–1118.
36. Spees J.L., Gregory C.A., Singh H., Tucker H.A., Peister A., Lynch P.J., Hsu S.C., Smith J., Prockop D.J. // *Mol. Ther.* 2004. V. 9. № 5. P. 747–756.
37. Sundin M., Ringdén O., Sundberg B., Nava S., Götherström C., Le Blanc K. // *Haematologica.* 2007. V. 92. № 9. P. 1208–1215.
38. Петёвка Н.В., Гончарова Н.В., Северин И.Н., Космачева С.М., Потапнёв М.П. // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* 2012. Т. 7. № 1. С. 40–48.
39. Sano-Martins I.S., Dabrowski Z., Tabarowski Z., Witkowska-Pelc E., Spadacci Morena D.D., Spodaryk K. // *Cell Tissue Res.* 2002. V. 310. № 1. P. 67–75.
40. Gao L., Chen X., Zhang X., Liu Y., Kong P., Peng X., Liu L., Liu H., Zeng D. // *Blood Cells Mol. Dis.* 2006. V. 36. № 2. P. 322–328.
41. Ławicki S., Mroczko B., Szmitkowski M. // *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2001. V. 55. № 3. P. 449–465.
42. Tursky M.L., Collier F.M., Ward A.C., Kirkland M.A. // *Cytotherapy.* 2012. V. 14. № 6. P. 679–685.
43. Hordyjewska A., Popiołek Ł., Horecka A. // *Cytotechnology.* 2015. V. 67. № 3. P. 387–396.
44. Grskovic B., Ruzicka K., Karimi A., Qujeq D., Müller M.M. // *Clin. Chim. Acta.* 2004. V. 343. № 1–2. P. 173–178.
45. Haylock D.N., To L.B., Dowse T.L., Juttner C.A., Simmons P.J. // *Blood.* 1992. V. 80. № 6. P. 1405–1412.
46. Broxmeyer H.E., Sherry B., Lu L., Cooper S., Oh K.O., Tekamp-Olson P., Kwon B.S., Cerami A. // *Blood.* 1990. V. 76. № 6. P. 1110–1116.
47. Broxmeyer H.E., Cooper S., Cacalano G., Hague N.L., Bailish E., Moore M.W. // *J. Exp. Med.* 1996. V. 184. № 5. P. 1825–1832.
48. Graham G.J., Wright E.G., Hewick R., Wolpe S.D., Wilkie N.M., Donaldson D., Lorimore S., Pragnell I.B. // *Nature.* 1990. V. 344. № 6265. P. 442–444.
49. Dexter T.M., Allen T.D., Lajtha L.G. // *J. Cell Physiol.* 1977. V. 91. № 3. P. 335–344.
50. Friedenstein A.J., Chailakhyan R.K., Latsinik N.V., Pan-asyuk A.F., Keiliss-Borok I.V. // *Transplantation.* 1974. V. 17. № 4. P. 331–340.
51. De Angeli S., Di Liddo R., Buoro S., Toniolo L., Conconi M.T., Belloni A.S., Parnigotto P.P., Nussdorfer G.G. // *Int. J. Mol. Med.* 2004. V. 13. № 3. P. 363–371.
52. McNiece I., Harrington J., Turney J., Kellner J., Shpall E.J. // *Cytotherapy.* 2004. V. 6. № 4. P. 311–317.
53. Corre J., Barreau C., Cousin B., Chavoin J.P., Caton D., Fournial G., Penicaud L., Casteilla L., Laharrague P. // *J. Cell Physiol.* 2006. V. 208. № 2. P. 282–288.
54. Jang Y.K., Jung D.H., Jung M.H., Kim D.H., Yoo K.H., Sung K.W., Koo H.H., Oh W., Yang Y.S., Yang S.E. // *Ann. Hematol.* 2006. V. 85. № 4. P. 212–225.
55. Kilroy G.E., Foster S.J., Wu X., Ruiz J., Sherwood S., Heifetz A., Ludlow J.W., Stricker D.M., Potiny S., Green P., et al. // *J. Cell Physiol.* 2007. V. 212. № 3. P. 702–709.
56. Nakao N., Nakayama T., Yahata T., Muguruma Y., Saito S., Miyata Y., Yamamoto K., Naoe T. // *Am. J. Pathol.* 2010. V. 177. № 2. P. 547–554.
57. De Toni F., Poglio S., Youcef A.B., Cousin B., Pflumio F., Bourin P., Casteilla L., Laharrague P. // *Stem Cells Dev.* 2011. V. 20. № 12. P. 2127–2138.

58. Жамбалова А.П., Даревская А.Н., Кабаева Н.В., Романов Ю.А., Буравкова Л.Б. // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2009. № 2. С. 89–95.
59. Петрова Т.В., Свиная Д.А., Нифонтова И.Н., Момотюк К.С., Савченко В.Г., Дризе Н.И. // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2006. № 4. С. 218–222.
60. Анисимов С.В. // Цитология. 2012. Т. 54. № 4. С. 289–297.
61. Mishima S., Nagai A., Abdullah S., Matsuda C., Taketani T., Kumakura S., Shibata H., Ishikura H., Kim S.U., Masuda J. // Eur. J. Haematol. 2010. V. 84. № 6. P. 538–546.
62. Haynesworth S.E., Baber M.A., Caplan A.I. // J. Cell. Physiol. 1996. V. 166. № 3. P. 585–592.
63. Majumdar M.K., Thiede M.A., Mosca J.D., Moorman M., Gerson S.L. // J. Cell. Physiol. 1998. V. 176. № 1. P. 57–66.
64. Буравкова Л.Б., Жамбалова А.П., Кабаева Н.В., Романов Ю.А. Стволовые клетки и регенеративная медицина. М.: Макс Пресс, 2011. С. 145–161.
65. Taichman R.S., Reilly M.J., Verma R.S., Emerson S.G. // Blood. 1997. V. 89. № 4. P. 1165–1172.
66. Ahmed N., Sammons J., Carson R.J., Khokher M.A., Hassan H.T. // Cell. Biol. Int. 2001. V. 25. № 5. P. 429–435.
67. Petit I., Szyper-Kravitz M., Nagler A., Lahav M., Peled A., Habler L., Ponomarev T., Taichman R.S., Arenzana-Seisdedos F., Fujii N., et al. // Nat. Immunol. 2002. V. 3. № 7. P. 687–694.
68. Kim J.W., Kim S.Y., Park S.Y., Kim Y.M., Kim J.M., Lee M.H., Ryu H.M. // Ann. Hematol. 2004. V. 83. № 12. P. 733–738.
69. Тепляшина А.С., Коржикова С.В., Шарифуллина С.З., Чупикова Н.И., Ростовская М.С., Савченкова И.П. // Цитология. 2005. Т. 47. № 2. С. 130–135.
70. Паюшина О.В., Домарацкая Е.И., Старостин В.И. // Изв. АН. Серия биологическая. 2006. № 1. С. 6–25.
71. Романов Ю.А., Даревская А.Н., Кабаева Н.В., Антонова О.А. // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2006. № 4. С. 206–211.
72. Шахпазян Н.К., Астрелина Т.А., Яковлева М.В. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2012. Т. 7. № 1. С. 23–33.
73. Маслова Е.В., Андреева Е.Р., Андрианова И.В., Бобылева П.И., Романов Ю.А., Кабаева Н.В., Балашова Е.Е., Ряскина С.С., Дугина Т.Н., Буравкова Л.Б. // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2013. № 4. С. 238–243.
74. Gimble J.M., Katz A.J., Bunnell B.A. // Circ. Res. 2007. V. 100. № 9. P. 1249–1260.
75. Parmar K., Mauch P., Vergilio J.A., Sackstein R., Down J.D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. № 13. P. 5431–5436.
76. Сотнезова (Маслова) Е.В., Горностаева А.Н., Андреева Е.Р., Романов Ю.А., Балашова Е.В., Буравкова Л.Б. // Цитология. 2015. Т. 57. № 6. С. 428–435.
77. Andreeva E.R., Andrianova I.V., Sotnezova E.V., Buravkov S.V., Bobileva P.I., Romanov Y.A., Buravkova L.B. // PLoS One. 2015. V. 10. № 4. P. e0124939.
78. Cipolleschi M.G., Dello Sbarba P., Olivetto M. // Blood. 1993. V. 82. P. 7. P. 2031–2037.
79. Shima H., Takubo K., Iwasaki H., Yoshihara H., Gomei Y., Hosokawa K., Arai F., Takahashi T., Suda T. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009. V. 378. № 3. P. 467–472.
80. Ivanovic Z., Hermite F., Brunet de la Grange P., Dazey B., Belloc F., Lacombe F., Vezon G., Praloran V. // Stem Cells. 2004. V. 22. № 5. P. 716–724.
81. Roy S., Tripathy M., Mathur N., Jain A., Mukhopadhyay A. // Eur. J. Haematol. 2012. V. 88. № 5. P. 396–405.
82. Ploemacher R.E., van der Sluijs J.P., Voerman J.S., Brons N.H. // Blood. 1989. V. 74. № 8. P. 2755–2763.
83. Jing D., Wobus M., Poitz D.M., Bornhäuser M., Ehninger G., Ordemann R. // Haematologica. 2012. V. 97. № 3. P. 331–339.
84. Буравкова Л.Б., Гринаковская О.С., Андреева Е.Р., Жамбалова А.П., Козионова М.П. // Цитология. 2009. Т. 51. № 1. С. 5–12.
85. Malladi P., Xu Y., Chiou M., Giaccia A.J., Longaker M.T. // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2006. V. 290. № 4. P. 1139–1146.
86. Wang D.W., Fermor B., Gimble J.M., Awad H.A., Guilak F. // J. Cell. Physiol. 2005. V. 204. № 1. P. 184–191.
87. Xu Y., Malladi P., Chiou M., Bekerman E., Giaccia A.J., Longaker M.T. // Tissue Eng. 2007. V. 13. № 12. P. 2981–2993.
88. Li Z., Wei H., Deng L., Cong X., Chen X. // FEBS J. 2010. V. 277. № 18. P. 3688–3698.
89. Koller M.R., Bender J.G., Papoutsakis E.T., Miller W.M. // Blood. 1992. V. 80. № 2. P. 403–411.
90. Andrade P.Z., de Soure A.M., Dos Santos F., Paiva A., Cabral J.M., da Silva C.L. // J. Tissue Eng. Regen. Med. 2015. V. 9. № 10. P. 1172–1181.
91. Andersson E.R., Sandberg R., Lendahl U. // Development. 2011. V. 138. № 17. P. 3593–3612.
92. Sethi N., Kang Y. // Br. J. Cancer. 2011. V. 105. № 12. P. 1805–1810.
93. Румянцев С.А., Осипова Е.Ю., Ипатов С.Е., Шаманская Т.В., Майорова О.А., Румянцев А.Г. // Онкогематология. 2011. Т. 6. № 1. С. 64–75.
94. Milner L.A., Kopan R., Martin D.I., Bernstein I.D. // Blood. 1994. V. 83. № 8. P. 2057–2062.
95. Delaney C., Varnum-Finney B., Aoyama K., Brashem-Stein C., Bernstein I.D. // Blood. 2005. V. 106. № 8. P. 2693–2699.
96. Zidar B.L., Shaddock R.K., Zeigler Z., Winkelstein A. // Am. J. Hematol. 1977. V. 3. P. 177–185.
97. Percival S.S. // Nutr. Rev. 1995. V. 53. № 3. P. 59–66.
98. Peled T., Landau E., Mandel J., Glukhman E., Goudsmid R.N., Nagler A., Fibach E. // Exp. Hematol. 2004. V. 32. № 6. P. 547–555.
99. Peled T., Mandel J., Goudsmid R.N., Landor C., Hasson N., Harati D., Austin M., Hasson A., Fibach E., Shpall E.J., Nagler A. // Cytotherapy. 2004. V. 6. № 4. P. 344–355.
100. de Lima M., McMannis J., Gee A., Komanduri K., Couriel D., Andersson B.S., Hosing C., Khouri I., Jones R., Champlin R., et al. // Bone Marrow Transplant. 2008. V. 41. № 9. P. 771–778.
101. Montesinos P., Peled T., Landau E., Rosenheimer N., Mandel J., Hasson N., Olesinski E., Glukhman E., Snyder D.A., Cohen E.G., et al. // Blood. 2013. V. 122. № 21. P. 295.
102. Peled T., Shoham H., Aschengrau D., Yackoubov D., Frei G., Rosenheimer G.N., Lerrer B., Cohen H.Y., Nagler A., Fibach E., et al. // Exp. Hematol. 2012. V. 40. № 4. P. 342–355.
103. Horwitz M.E., Chao N.J., Rizzieri D.A., Long G.D., Sullivan K.M., Gasparetto C., Chute J.P., Morris A., McDonald C., Waters-Pick B., et al. // J. Clin. Invest. 2014. V. 124. № 7. P. 3121–3128.
104. Boitano A.E., Wang J., Romeo R., Bouchez L.C., Parker A.E., Sutton S.E., Walker J.R., Flaveny C.A., Perdew G.H., Denison M.S., Schultz P.G., Cooke M.P. // Science. 2010. V. 329. № 5997. P. 1345–1348.
105. Wagner W., Wein F., Roderburg C., Saffrich R., Faber A., Krause U., Schubert M., Benes V., Eckstein V., Maul H., et al. // Exp. Hematol. 2007. V. 35. № 2. P. 314–325.
106. Hoggatt J., Singh P., Sampath J., Pelus L.M. // Blood. 2009. V. 113. № 22. P. 5444–5455.
107. Robinson S.N., Simmons P.J., Thomas M.W., Brouard N., Javni J.A., Trilok S., Shim J.S., Yang H., Steiner D., Decker W.K., et al. // Exp. Hematol. 2012. V. 40. № 6. P. 445–456.
108. Xia L., McDaniel J.M., Yago T., Doeden A., McEver R.P. // Blood. 2004. V. 104. № 10. P. 3091–3096.
109. Tashiro K., Tada H., Heilker R., Shirozu M., Nakano T., Honjo T. // Science. 1993. V. 261. № 5121. P. 600–603.

110. Kim C.H., Broxmeyer H.E. // *Blood*. 1998. V. 91. № 1. P. 100–110.
111. Aiuti A., Webb I.J., Bleul C., Springer T., Gutierrez-Ramos J.C. // *J. Exp. Med.* 1997. V. 185. № 1. P. 111–120.
112. Bleul C.C., Fuhlbrigge R.C., Casasnovas J.M., Aiuti A., Springer T.A. // *J. Exp. Med.* 1996. V. 184. № 3. P. 101–109.
113. Peled A., Petit I., Kollet O., Magid M., Ponomaryov T., Byk T., Nagler A., Ben-Hur H., Many A., Shultz L., et al. // *Science*. 1999. V. 283. № 5403. P. 845–848.
114. Christopherson K.W. 2nd, Paganessi L.A., Napier S., Porecha N.K. // *Stem Cells Dev.* 2007. V. 16. № 3. P. 355–360.
115. Broxmeyer H.E., Hoggatt J., O'Leary H.A., Mantel C., Chitteti B.R., Cooper S., Messina-Graham S., Hangoc G., Farag S., Rohrabough S.L., et al. // *Nat. Med.* 2012. V. 18. № 12. P. 1786–1796.
116. Farag S.S., Srivastava S., Messina-Graham S., Schwartz J., Robertson M.J., Abonour R., Cornetta K., Wood L., Secrest A., Strother R.M., et al. // *Stem Cells Dev.* 2013. V. 22. № 7. P. 1007–1015.
117. Avigdor A., Goichberg P., Shivtiel S., Dar A., Peled A., Samira S., Kollet O., Hershkoviz R., Alon R., Hardan I., et al. // *Blood*. 2004. V. 103. № 8. P. 2981–2989.
118. Wysoczynski M., Reca R., Ratajczak J., Kucia M., Shirvaikar N., Honczarenko M., Mills M., Wanzeck J., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak M.Z. // *Blood*. 2005. V. 105. № 1. P. 40–48.