

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ
Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина

Биологический факультет

ИНФОРМАЦИОННО-АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР

на тему: «методы культивирования с использованием стволовых клеток в
онкогематологии»

Выполнила:

Студентка 3 курса

Группы БМ-31

Василенко Валерия Игоревна

Проверила:

канд.б.н, доцент

Мартыненко В. В.

Харьков -2017

Содержание

Оглавление

Вступление	3
Онкогематология	4
Трансплантация	6
Культивирование	20
Заключение.....	27
Список использованных информационных источников	28

Вступление

Целью данной работы является проведение информационно-аналитического обзора по методам культивирования стволовых клеток и использованием в онкогематологии.

Данная работа является актуальной, так как за последние 20 лет количество онкогематологических заболеваний заметно увеличилось, и ученые постоянно находятся в разработке новых методов лечения заболеваний данной группы.

Работа подразделена на 3 части: первая посвящена онкогематологии, характеристике данной группы заболеваний; вторая посвящена процедуре трансплантации, которая является одним из эффективных методов лечения онкогематологических заболеваний. Третья часть посвящена обзору методов культивирования, требованиям, предъявляемым к культуральным средам, также приведена одна из методик культивирования.

Онкогематология

Онкогематология – область медицины, находящаяся на стыке гематологии и онкологии и изучающая злокачественные заболевания кроветворной системы, а также пре-злокачественные миелодисплазии, их этиологию, патогенез, диагностику и лечение.[1]

Злокачественные заболевания кроветворной системы также называют гемобластозами. В структуре гемобластозов выделяют миелопролиферативные и лимфопролиферативные заболевания. Первые представлены лейкозами (лейкемией) – злокачественными опухолями кроветворной ткани с первичным поражением костного мозга; вторые – гематосаркома, или лимфома – внекостномозговыми объемными образованиями с первичным локальным ростом, преимущественно в лимфоузлах. То есть, лейкозы от лимфом отличаются системностью поражения, т.к. первые изначально проявляются в костном мозге, а лимфомы – локально. Однако по мере прогрессирования, лейкозы и лимфомы могут трансформироваться друг в друга. Так, при лейкозах может возникать метастазирование опухолевых клеток в плевру, брюшину, яички, лимфоузлы, мозговые оболочки. В то же время, на определенном этапе развития лимфомы в патологические процессы может вовлекаться костный мозг. В некоторых случаях гемобластоз изначально развивается как лимфома-лейкоз – заболевание, сочетающее признаки костномозгового и внекостномозгового поражения.[1, 2]

В большинстве случаев первыми признаками гемобластозов являются неспецифические симптомы общей интоксикации – длительное немотивированное повышение температуры, утомляемость, потливость, снижение функциональной активности. Характерна генерализованная лимфаденопатия, которая проявляется в увеличении шейных, подмышечных, паховых лимфоузлов. Типичны боли в костях, вызванные увеличением объема костного мозга. Вследствие сдавления верхней полой вены увеличенными

внутригрудными лимфоузлами появляется одышка, отеки лица, шеи, верхних конечностей. [1, 2]

Основанием для подозрения на гемобластоз (кроме клинической картины заболевания), служат изменения гемограммы. Гемограмма включает в себя подсчет эритроцитов, тромбоцитов, определение количества и морфологии лейкоцитов и лимфоцитов. Отклонения от нормы могут варьировать в зависимости от вида гемобластоза. Всех пациентов с отклонениями в общем анализе крови направляют к гематологу для уточнения диагноза, где проводят трепанобиопсию (стернальную пункцию), пункционную или открытую биопсию лимфатических узлов. Полученный материал исследуют с помощью цитохимических, цитогенетических, гистологических методов. [1, 2]

Для различных видов гемобластозов разработаны стандартизированные программы лечения. Общими принципами являются помещение пациента в изолированную палату с повышенным уровнем защиты от проникновения инфекции, проведение терапии, направленной на редукцию и консолидацию ремиссии. Обычно в качестве первой линии терапии гемобластозов избирается высокодозная моно- или полихимиотерапия цитостатическими препаратами. При достижении положительной динамики по результатам миелограммы, дозировка химиопрепаратов снижается до поддерживающей. С целью коррекции картины крови осуществляется заместительная трансфузионная терапия. Профилактика инфекционных осложнений предполагает назначение антибактериальных и антимикотических препаратов. В дополнение к цитостатической терапии может быть показано проведение гормональной терапии. Эффективным и перспективным методом лечения гемобластозов является трансплантация костного мозга, однако основная сложность данной процедуры заключается в подборе HLA – совместимого донора. [1,2]

Трансплантация

Как было сказано выше, трансплантация костного мозга, или трансплантация (гемопоэтических) клеток костного мозга, является перспективным и более чем эффективным методом лечения гемобластозов.

Выделяют различные линии и типы стволовых клеток, и не все они подходят для трансплантации при онкогематологических заболеваниях. Рассмотрим это более подробно.

В литературе чаще всего используют две классификации стволовых клеток:

- по способности к дифференцировке;
- по источнику их происхождения или выделения.[3]

Соответственно, по способности к дифференцировке выделяют:

- тотипотентные (способны образовывать клетки любых типов) - оплодотворенный ооцит и бластомеры 2-8 клеточной стадии;
- плюрипотентные (способны образовывать клетки многих, но не всех типов) – эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), первичные половые клетки и клетки эмбриональных карцином;
- мультипотентные (способны образовывать клетки нескольких типов);
- унипотентные (способны дифференцироваться только в один тип клеток).[3]

По происхождению и источнику выделения стволовые клетки (СК) подразделяют на следующие группы:

- эмбриональные стволовые клетки – получают из внутренней клеточной массы бластоциста, которые формируются к 4-7 дню развития после оплодотворения; эти СК способны дифференцироваться во все типы клеток

взрослого организма, т.е. являются тотипотентными; основным источником ЭСК является абортивный материал или материал, оставшийся после искусственного оплодотворения;

- фетальные стволовые клетки – получают из абортивного материала на 9-12 неделе беременности, являют собой смесь мультипотентных и унипотентных стволовых клеток;

- СК пуповинной и плацентарной крови (СКП) – источником стволовых клеток является плацентарно-пуповинная кровь, являются плюрипотентными;

- СК взрослого организма – унипотентные СК:

- СК кожи
- СК жировой ткани
- СК нервной ткани
- СК мышечной ткани
- СК костного мозга
 - Гемопоетические СК (ГКС)
 - Мезенхимальные (стромальные) СК
 - Мультипотентные взрослые прогениторные клетки
- резидентные СК сердца.[3]

Из всех вышеперечисленных типов стволовых клеток при трансплантациях в онкогематологии используются именно гемопоетические стволовые клетки (ГСК).

ГСК могут быть получены различными путями, охарактеризуем каждый из них:

- из эмбриональных стволовых клеток в процессе их дальнейшей направленной дифференцировки, однако использование эмбриональных клеток сопряжено с рядом религиозных и моральных проблем;

- из фетальных стволовых клеток, но этот способ получения также не является этически корректным;

- из пуповинной и плацентарной крови – метод приемлем с точки зрения этики и является безболезненным, однако недостатками является то, что забор крови возможно сделать всего лишь один раз в жизни - в момент рождения, а также то, что лишь в каждом четвертом образце пуповинной крови стволовые клетки находятся в количестве, достаточном для трансплантации взрослому пациенту;

- СК могут быть получены непосредственно из взрослого организма в виде ГСК. [3]

Суммируя и дополняя вышеизложенное, можем выделить виды трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток называется использование взвеси гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) (аутологичных, аллогенных) после назначения реципиенту максимально переносимых (миелоаблативных) доз цитостатических препаратов и (или) лучевой терапии (ТОТ).[4]

В зависимости от источника получения трансплантируемых клеток ТГСК подразделяется на следующие виды:

1) аллогенную трансплантацию костного мозга (алло-ТКМ), при которой источником ГСК является костный мозг здорового человека (родственного или неродственного донора), полностью или частично совместимого с реципиентом по HLA-системе;

2) аллогенную трансплантацию периферических стволовых клеток крови (алло-ТПСКК), когда в качестве источника ГСК используют периферические стволовые клетки крови (ПСКК) здорового человека (родственного или неродственного донора), полностью или частично

совместимого с реципиентом по HLA-системе, полученные путем машинного афереза после мобилизации ГСК в кровь рекомбинантными факторами роста – гранулоцитарным / гранулоцитарано-макрофагальным колониестимулирующим фактором – G-KSF, GM-KSF (Г-КСФ, ГМ-КСФ);

3) аллогенную трансплантацию ГСК пуповинной крови;

4) аутологичную трансплантацию костного мозга (ауто-ТКМ), когда источником ГСК является костный мозг больного, находящегося в состоянии полной клинико-гематологической ремиссии или не имеющего признаков поражения метастатическим процессом;

5) аутологичную трансплантацию периферических стволовых клеток крови (ауто-ТПСКК), при которой ГСК получены из периферической крови больного путем машинного афереза после мобилизации ГСК в кровь рекомбинантными факторами роста – Г-КСФ, ГМ-КСФ;

6) сингенную ТКМ или ТПСКК, при которой донором ГСК является гомозиготный близнец, генетически абсолютно идентичный с реципиентом. [4]

Наибольший опыт по трансплантации ГСК пуповинной крови накоплен у детей, поскольку применение данного вида трансплантации у взрослых ограничено в связи с малым объемом трансплантата и соответственно не всегда достаточным для взрослого человека количеством ГСК.[4]

Сообщений о проведении аутологичной трансплантации ГСК пуповинной крови до настоящего времени нет, но теоретически такая возможность существует. Выполнение этого вида ТГСК будет зависеть от степени развития специальных банков по хранению генетического материала с перспективой его использования в течение жизни человека в случае развития злокачественного заболевания системы крови.[4]

В процедуре трансплантации ККМ участвуют донор – источник ГСК, и реципиент – тот, кому будут введены ГСК.

При любой методике трансплантации ГСК можно выделить следующие этапы:

- 1) определение показаний и противопоказаний;
- 2) выбор донора (при аллогенной трансплантации);
- 3) получение костного мозга/стволовых клеток их обработка, хранение и введение;
- 4) кондиционирование (иммуносупрессивная терапия);
- 5) профилактика и лечение осложнений периода цитопении;
- 6) профилактика и лечение поздних осложнений.[5]

Первый пункт – показания к трансплантации ГСК были рассмотрены выше.

Второй пункт – подбор донора костного мозга, совместимого с реципиентом по HLA-системе, является одним из основных факторов, обуславливающих успешность выполнения алло-ТГСК. [4] За совместимость донора и реципиента отвечают гены МНС (Major Histocompatibility Complex), которые играют центральную роль во многих иммунологических реакциях, обеспечивая кодирование антигенов гистосовместимости (трансплантационных антигенов) человека 1, 2, 3 класса HLA-системы. Антигены МНС определяют несовместимость тканей при пересадках и индуцируют реакции отторжения трансплантатов – реакции трансплантат против хозяина (РТПХ).[7] Донором костного мозга может быть полностью совместимый по HLA-системе здоровый человек без ограничения по возрасту. В случае отсутствия полностью совместимого донора костного мозга обсуждается вопрос об использовании донора, частично совместимого по 1, 2 или 3 антигенам HLA-системы. При выборе донора костного мозга не имеют значения различия по группе крови и половой хромосоме.[4] Идеальным донором ГСК считают однояйцевого

близнеца, менее совместимы будут родные братья и сестры (сибсы), после - родители, и наименее совместимы неродственные доноры.

Только 30 % больных при показаниях к алло-ТГСК имеют совместимого по HLA-системе родственного донора. В связи с этим большое значение приобретает развитие сети регистров доноров костного мозга — здоровых лиц, на добровольных началах согласных на эксфузию у них костного мозга. В настоящее время в мире насчитывается около 50 регистров, расположенных в 32 странах, с общим числом потенциальных доноров костного мозга около 4 000 000 человек. Самым большим является Северо-американский регистр доноров костного мозга, имеющий информацию о более чем 3 000 000 доноров.[4]

Также все большее значение приобретают банки стволовых клеток пуповинной крови — организации, занимающиеся длительным криогенным хранением пуповинной крови. Существуют публичные и частные банки. В публичные (донорские) банки принимают кровь добровольно и бесплатно, поэтому они чаще всего финансируются государством; использовать такую кровь могут для любого нуждающегося. Частные банки хранят образцы за плату и, в случае, если ребенку или его близким родственникам будет необходима трансплантация, предоставляют кровь.[6]

В 2004 году в Киеве на базе Института клеточной терапии был создан «Первый криобанк стволовых клеток пуповинной крови». С 2007 года на базе Института неотложной и восстановительной медицины им. В. К. Гусака в Международном центре биотехнологий «Биостэм» начал свою работу криобанк пуповинной крови. С 2005 года на Украине функционирует Семейный банк пуповинной крови «Гемафонд», предоставляющий возможность частного криохранения стволовых клеток пуповинной крови. На сегодня на Украине работают 4 организации, собирающие и хранящие пуповинную кровь.[6]

С 2011 года все организации, занимающиеся долгосрочным хранением пуповинной крови, должны иметь лицензию на «Деятельность банков пуповинной крови, других тканей и клеток человека».[6]

Третий пункт будет рассмотрен более подробно ниже.

Касаемо четвертого пункта – кондиционирования, или иммуносупрессивной терапии, то задача кондиционирования - обеспечить глубокую депрессию иммунной системы, а при онкологических заболеваниях и уничтожение оставшихся опухолевых клеток при умеренной токсичности для других органов и систем, а также создании условий для успешного приживления трансплантата.[4, 5]

Для проведения кондиционирования используются стандартные протоколы, в которых указываются дни, часы, дозы и длительность введения цитостатиков, симптоматических препаратов (антибактериальных, седативных, противорвотных и др., объем и характер инфузии), при необходимости - порядок проведения лучевой терапии. Протоколы кондиционирования различаются в зависимости от характера заболевания и типа трансплантации.[5]

Пятый и шестой пункты – профилактика и лечение осложнений периода цитопении и поздних осложнений – основаны на том, что вскоре после окончания кондиционирования и введения СКК у больного развивается аплазия костного мозга (период отсутствия костного мозгового кроветворения), которая проявляется практически полным отсутствием клеток крови (панцитопенией) и продолжается в среднем 4 недели. Этот период опасен развитием тяжелых осложнений (инфекции, кровоточивость и т.д.). [5]

Основную опасность в периоде цитопении представляют инфекционные осложнения, поэтому их профилактика, своевременное и адекватное лечение являются необходимым условием успешной ТКМ.[5]

Профилактика инфекционных осложнений начинается в среднем за 2 недели до трансплантации и включает:

- помещение больного в стерильный бокс и проведение необходимых санитарно-гигиенических мероприятий (обработка кожи, слизистых оболочек и перианальной области дезинфицирующими растворами);
- подавление микрофлоры кишечника с помощью антибактериальных и противогрибковых препаратов.[5]

Также по показаниям проводится переливание компонентов крови (эритроцитарная масса, тромбомасса, плазма).[5]

Приживление костного мозга или СКК периферической крови констатируют по результатам анализа костного мозга. Вскоре количество нейтрофилов достигает концентрации $0,5 \cdot 10^9/\text{л}$, а тромбоцитов – $20 \cdot 10^9/\text{л}$, что означает окончание периода цитопении.[5]

При аллогенных трансплантациях проводится профилактика и лечение реакции трансплантат против хозяина (РТПХ). Острая РТПХ развивается в первые 100 дней после трансплантации, хроническая - в более поздние сроки. Для профилактики и лечения РТПХ в большинстве случаев используются иммунодепрессанты - циклоспорин А, метотрексат, преднизолон, моноклональные антитела.[5]

В течение года и далее после трансплантации (преимущественно аллогенной) могут возникать различные поздние осложнения (поражение кожи и слизистых, печени, почек, легких, глаз, костей и мышц, эндокринные нарушения, сексуальные расстройства, аутоиммунные заболевания), лечение которых в большинстве случаев проводится по общим принципам и не имеет существенных особенностей. Особого внимания заслуживают злокачественные новообразования, развивающиеся после трансплантации.[5]

После химиотерапии и достижения очередной ремиссии при удовлетворительном состоянии пациента может быть проведена вторая ТКМ или ТСКК.[5]

Вернемся к пункту 3 - получение костного мозга/стволовых клеток их обработка, хранение и введение.

Получение костного мозга

Взятие костного мозга выполняют под общей анестезией, хотя возможно использование и перидуральной анестезии. Костный мозг аспирируют иглами большого диаметра путем множественных пункций гребня крыла подвздошной кости с обеих сторон в шприцы, содержащие антикоагулянт (гепарин). Объем костного мозга, получаемый в результате эксфузии, не должен превышать 10—15 мл на 1 кг массы тела донора. Клеточность костного мозга (трансплантата) должна составлять более $1,0 \cdot 10^8$ ядро содержащих клеток на 1 кг массы тела реципиента.[4]

Процедура эксфузии костного мозга не вызывает серьезных осложнений у 99 % доноров. Однако развитие осложнений может быть обусловлено влиянием общей анестезии или состоянием после быстрой кровопотери. При анализе 2027 операций заготовки костного мозга у доноров, по данным Международного регистра доноров костного мозга, и 1270 миелоэксфузий, выполненных в Центре трансплантации костного мозга (Сиэтл, США), выявлено, что только в 0,27 % случаев наблюдались угрожающие жизни осложнения; сердечная недостаточность, эмболии легочных артерий, аспирационные пневмонии, церебральные инфаркты. Другие осложнения (бактериемия, инфицирование мест пункций, гематомы в области операционного поля, лихорадка, перелом иглы при эксфузии, требующий оперативного вмешательства, перелом в области передней части гребня крыла

подвздошной кости) также возможны наряду с развитием ДВС-синдрома и возникновением воздушной эмболии.[4]

С целью профилактики развития острой реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) возможно удаление Т-лимфоцитов с помощью моноклональных антител из аллогенного костного мозга перед его введением реципиенту. Однако Т-клеточное «истощение» костного мозга перед алло-ТКМ может приводить к негативным последствиям: замедленному приживлению трансплантата, увеличению вероятности его отторжения, а также возрастанию числа рецидивов основного заболевания.[4]

Аутологичный костный мозг может быть «очищен» от примеси злокачественных клеток *in vitro* с использованием цитостатических препаратов (мафосфамид, 4-гидропероксициклофосфан и др.), моноклональных антител к антигенам злокачественных клеток, олигонуклеотидов, прерывающих синтез специфических белков, или путем длительного культивирования в жидких средах. Альтернативным вариантом является возможность выделения популяции CD34+ клеток иммунологическими методами «позитивной» и «негативной» селекции.[4]

После эксфузии аутологичный костный мозг, как правило, подвергается криоконсервированию с использованием криопротекторов: клеточного — диметилсульфоксида (ДМСО) и внеклеточного — гидроксиэтилкрахмала и последующим программным или непрограммным замораживанием. Механизм криозащитного действия криопротектора связан с его способностью соединять молекулы воды, что приводит к замедлению вовлечения их в растущие кристаллы, а это в свою очередь препятствует быстрому нарастанию осмолярности среды и снижает осмотическую нагрузку на клетки. При программном замораживании скорость охлаждения 1—3 °C/мин до окончания этапа кристаллизации считается оптимальной. Хранение замороженных клеток может осуществляться при температуре от -85 DC (до 6 мес. в

низкотемпературной холодильной установке) до -196°C (в течение нескольких лет в жидком азоте или в его парах).[4]

Использование метода культивирования клеток костного мозга или ПСКК в различных средах помогает оценить влияние хранения на жизнеспособность гемопоэтических стволовых клеток и возможную скорость приживления. Тем не менее, самым адекватным способом определения качества трансплантата является количественный способ идентификации CD34+ клеток с помощью специфических антител.[4]

Инфузию костного мозга реципиенту при алло-ТГСК или сингенной ТГСК производят внутривенно через 24—48 ч после окончания химиолучевой терапии. Аутологичный костный мозг/ПСКК вводят аналогичным способом в те же сроки, максимально быстро после размораживания при температуре $42—45^{\circ}\text{C}$.[4]

Получение периферических стволовых клеток крови

До последнего времени основным источником ГСК при трансплантации был костный мозг (аллогенный, аутологичный). Вместе с тем получение костного мозга для трансплантации имеет ряд недостатков (необходимость общей анестезии, болевой синдром в месте эксфузии, высокая вероятность контаминации опухолевыми клетками). Кроме того, часто эксфузию костного мозга невозможно осуществить у больных после лучевой и интенсивной химиотерапии из-за развития гипоцеллюлярности костного мозга, а также у больных с массивным миелофиброзом. В связи с этим были предложены методы выделения ПСКК, физиологической основой которых явились данные о выходе гемопоэтических стволовых клеток из костного мозга в кровь. Трансплантация периферических стволовых клеток крови имеет ряд преимуществ по сравнению с трансплантацией костного мозга:

1) при получении ПСКК нет необходимости в общей анестезии, а следовательно, существует возможность выделения ПСКК в амбулаторных условиях;

2) восстановление гранулоцитарного, тромбоцитарного и эритроидного ростков гемопоэза после режима кондиционирования происходит быстрее в случае ТПСКК;

3) при использовании ауто-ПСКК вероятность примеси злокачественных клеток в трансплантате (при ремиссии заболевания) меньше по сравнению с аутологичным костным мозгом;

4) после афереза ПСКК нет необходимости в проведении компонентной терапии.[4]

Совершенствование процедуры ТПСКК привело к разработке эффективных методов концентрации ПСКК. Выделение ПСКК осуществляется методом лейкоафереза с помощью клеточных сепараторов с перемежающимся током крови (Наemo-netics MCS-3P) и постоянным током крови: SPECTRA-COBE, CS-3000 и CS-3000 PLUS (фирма «Baxter»), FRESINIUS AS-104 и FRESINIUS-204 (фирма «Fresenius»). Для выделения ПСКК у детей применяют специальные камеры, позволяющие проводить аферез у ребенка, имеющего малый объем циркулирующей крови.[4]

Мобилизация ПСКК может выполняться с помощью цитостатиков (циклофосфан в дозе 4—7 г/м², ифосфамид — 5—7,5 г/м²). Основным средством для мобилизации ПСКК являются рекомбинантные ростовые факторы Г-КСФ и ГМ-КСФ (нейпоген, граноцит, лейкомакс) в дозе 10 мкг/кг в сутки в течение 5—6 дней. Аферез ПСКК проводят обычно на 4-й, 5-й и 6-й дни. В это время наблюдается значительное повышение количества лейкоцитов периферической крови (в 4—10 раз), сопровождающееся увеличением уровня клеток-предшественников различных линий гемопоэза и ГСК (CD34⁺ клетки). Критерием адекватности дозы ПСКК для аутологичной трансплантации ПСКК

является количество мононуклеаров, превышающее $4\text{—}8,0 \cdot 10^8/\text{кг}$ или CD34^+ клеток более $5,0 \cdot 10^8/\text{кг}$. [4]

CD34^+ клетки характеризуются наличием высокогликозилированного мембранного гликопротеина с молекулярной массой 115 кД, функция которого окончательно не установлена. CD34 экспрессируется на гемопоэтических стволовых клетках, субпопуляциях стромальных клеток, эндотелии мелких сосудов различных тканей. Идентификация CD34^+ клеток возможна иммунологическими методами в 1—4 % клеток нормального костного мозга, пуповинной крови или ГСК периферической крови после их мобилизации с помощью рекомбинантных ростовых факторов. Криоконсервирование ПСКК осуществляют методом, аналогичным замораживанию костного мозга.[4]

Методика аллогенной трансплантации.

Трансфузия КМ и ПСКК проводится в день 0 в периферическую вену со скоростью 500 мл/ч. За 30 мин до начала переливания костномозговой взвеси проводится премедикация, состоящая из внутривенной струйной инфузии противошоковых и диуретических препаратов.[8]

Методика аутологичной трансплантации.

В день трансплантации (день 0) пакеты с замороженным трансплантатом, находящиеся в емкости с жидким азотом, доставляются в палату. Размораживание пакетов производится в асептических условиях в водяной бане при температуре 43°C непосредственно перед реинфузией взвеси гемопоэтических стволовых клеток больному, которая осуществляется шприцами емкостью 50 мл в ЦВК струйно медленно. В связи с низкой температурой инфузируемой смеси и угрозой развития осложнений целесообразно проведение мониторинга показателей деятельности сердечно-сосудистой системы. В большинстве случаев при введении охлажденной клеточной взвеси наблюдается брадикардия, несмотря на предварительное введение атропина. В отдельных случаях наблюдаются следующие

осложнения: одышка, кашель, тошнота, рвота, кожная реакция по типу эритемы, артериальная гипертензия, гиперсаливация. Реинфузия размороженных клеток часто сопровождается незначительным гемолизом, требующим контроля уровня гемоглобина и эритроцитов крови, а также выполнения серии общих анализов мочи.[8]

Культивирование

Как уже обсуждалось выше, оптимальным источником получения ГСК является пуповинная кровь. ГСК, полученные из пуповинной крови, обладают рядом существенных преимуществ над ГСК костного мозга: во-первых, средний возраст донора костного мозга составляет 40 лет, тогда как ГСК пуповинной крови берут у новорожденного, что особенно важно, когда реципиентом является ребенок; во-вторых, при трансплантации полученных из пуповинной крови ГСК существенно снижается риск развития РТПХ, поскольку иммунные клетки пуповинной крови еще находятся в примитивном (недоразвитом) состоянии. К преимуществам ГСК пуповинной крови относятся также высокая пролиферативная активность и низкий риск передачи таких инфекций, как цитомегаловирус и вирус Эпштейна-Бара (EBV, HHV-4). Использование ГСК пуповинной крови не предполагает длительного поиска подходящего донора, и клетки могут использоваться немедленно, что, однако, несет генетические риски.[9]

Однако использование ГСК пуповинной крови для лечения взрослых пациентов до сих пор остается ограниченным. Одной из главных причин этого является малый объем образца пуповинной крови по сравнению с объемом костного мозга, что может приводить к замедлению приживания или отторжению трансплантируемого образца. Считается, что определяющим фактором успеха трансплантации является количество гемопоэтических стволовых клеток и общее количество ядродержащих клеток в образце пуповинной крови. Поэтому среди методов улучшения исходов трансплантации ГСК пуповинной крови актуальной является проблема чистого выделения и экспансии CD34⁺ гемопоэтических стволовых клеток *in vitro*. [8]

Культивирование клеток происходит на синтетических питательных средах, в состав которых могут входить: L-глутамин, гентамицин, фенол

красный, человеческий или рекомбинантный трансферин в различных сочетаниях и соотношениях. [10]

Существует несколько критериев, которым должны соответствовать ГСК, полученные в результате экспансии *in vitro*:

- условия культивирования должны обеспечивать преимущественное самообновление (экспансию) ГСК при минимальной дифференцировке, с тем чтобы в конечном продукте увеличивалось содержание именно примитивных стволовых гемопоэтических клеток;
- композиция клеток в образце, полученном в результате экспансии, должна быть оптимальна с точки зрения максимального сокращения времени наступления терапевтического эффекта после трансплантации;

количество полученных ГСК должно быть достаточным при использовании относительно небольшой стартовой популяции клеток, что позволило бы использовать относительно небольшой по объему образец костного мозга или индивидуальный образец пуповинной крови.[11]

Достижение таких результатов стало возможным благодаря исследованию межклеточных взаимодействий в гемопоэтической нише, которая является сложной клеточной системой. Данная ниша включает в себя клетки стромы костного мозга, эндотелиальные клетки, остециты, остеобласты, адипоциты, преадипоциты и компоненты внеклеточного матрикса. В нормальных условиях значительная доля ГСК находится в нише в стабильном, неактивном состоянии, и ГСК активируются лишь при необходимости запуска гемопоэза в случае получения соответствующих физиологических сигналов: например, после химиотерапии или кровопотери. Взаимодействие гемопоэтических клеток и ниши костного мозга играет важную роль в запуске сигнальных путей, регулирующих гемопоэз не только в норме, но и в патологических состояниях.[11]

Считается, что существуют две гемопоэтические ниши костного мозга: остеобластная и сосудистая. В ходе многолетних исследований было показано, что большая часть примитивных гемопоэтических клеток локализована в остеобластной нише костного мозга в окружении стромальных клеток и остеобластов, что стимуляция наращивания остеобластов сопровождалась увеличением числа примитивных ГСК и что взаимодействия ГСК с остеобластами и клетками стромы в нише способствуют поддержанию и самообновлению пула неактивных ГСК. ГСК обнаруживаются и в окружении эндотелиальных клеток синусоидов и перицитов, в сосудистой нише. Полагают, что эта ниша формирует микроокружение, способствующее пролиферации, дифференцировке и трансэндотелиальной миграции гемопоэтических клеток.[11]

Важным различием между этими нишами и модулятором сигнала является уровень кислорода в микроокружении. Очевидно, что в норме в сосудистой нише уровень кислорода существенно выше, чем в остеобластной нише, и различия в уровне содержания кислорода в микроокружении ГСК могут служить для них сигналом к выходу из фазы G_0 клеточного цикла и началу деления и дифференцировки и выхода зрелых клеток в кровоток. Когда потребность организма в зрелых клетках крови удовлетворена, ГСК прекращает делиться, покидает сосудистую нишу, выходит из клеточного цикла и возвращается в остеобластную нишу, где остается в фазе G_0 до следующего сигнала.[11]

Существующие методы экспансии ГСК in vitro

Жидкая культура. В условиях *in vivo* клетки гемопоэтического окружения секретируют цитокины и факторы роста, необходимые для контроля и поддержания гемопоэза, необходимые для контроля и поддержания гемопоэза. Одним из основных методов экспансии *in vitro* является культивирование ГСК в среде, содержащей коктейль факторов роста и других веществ, стимулирующих рост клеток. ГСК ($CD34^+$ или $CD133^+$) выделяют из костного

мозга, периферической крови (после мобилизации) или пуповинной крови одним из методов, позволяющих получить препарат, пригодный для клинического использования и культивируют в среде, стимулирующей экспансию. Состав культуральной среды может варьировать, и ее традиционными компонентами являются фактор стволовых клеток (SCF, также КИТ-лиганд), интерлейкины 3 и 6, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, тромбопоэтин и лиганд Flt-3. При этом результаты экспансии, проводимой с использованием разных коктейлей цитокинов в разных лабораториях, не всегда коррелируют с концентрацией стимулирующих агентов.

Сокультивирование ГСК с клетками стромы. Недостаток метода экспансии ГСК в жидкой среде очевиден: в данном случае ГСК лишены поддержки микроокружения, и их экспансия поддерживается лишь цитокинами и факторами роста, содержащимися в культуральной среде, зачастую стимулирующими не только самообновление примитивных ГСК, сколько нежелательную дифференцировку. Сокультивирование гемопоэтических клеток с мезенхимными стволовыми клетками (МСК) (даже аллогенными) может восстановить некоторые межклеточные взаимодействия, характерные для стромы костного мозга и ГСК в гемопоэтической нише. Наличие при контактном сокультивировании МСК и ГСК центров гемопоэза и участков активного деления гемопоэтических клеток, связанных адгезивными взаимодействиями с подложкой МСК, свидетельствует о том, что МСК выполняют не только функцию питающей подложки и секретируют факторы роста, но и участвуют в регуляции поведения ГСК через непосредственный межклеточный контакт, моделируя таким образом некоторые свойства гемопоэтической ниши.

Перспективным является направленный поиск типов клеток, способных проявлять по отношению к ГСК свойства фидерных (питающих) клеток. Наиболее перспективным является применение МСК, которые обладают

фидерными свойствами, высокой пролиферативной активностью и являются более доступными, чем иные типы фидерных клеток человеческого происхождения. Эти факторы определяют возможность экспансии ГСК *in vitro* на аутологичных фидерных клетках, что имеет большое практическое значение.

На разных стадиях гемопоэза существует несколько основных популяций гемопоэтических клеток:

1) малочисленная популяция неактивных, очень медленно делящихся примитивных ГСК, способных поддерживать гемопоэз спустя длительное время после трансплантации; обогащение образца для трансплантации именно этой фракцией является особенно важным при экспансии *in vitro*; иммунофенотип этих клеток описывают как $CD34^{+}CD38^{-}CD90^{+}$;

2) популяция ГСК, способных поддерживать гемопоэз в течение непродолжительного времени после трансплантации - от нескольких недель до нескольких месяцев; их иммунофенотип описывают как $CD34^{+}CD38^{-}$, эта популяция клеток отвечает за увеличение скорости приживания трансплантата;

3) популяции мультипотентных предшественников, которые также на начальных стадиях развития имеют иммунофенотип $CD34^{+}CD38^{-}$, а на поздних этапах созревания начинают терять экспрессию CD34 и экспрессировать специфичные для данной линии антигены;

этапы дальнейшего созревания гемопоэтических клеток включают в себя

4) стадию образования коммитированных предшественников;

5) стадию образования прекурсоров – клеток со специфичным потенциалом дифференцировки;

6) зрелые клетки крови.

Таким образом, идеальный протокол экспансии *in vitro* должен обеспечивать оптимальный состав образца для трансплантации: образец должен содержать достаточное количество примитивных ГСК,

поддерживающих гемопоэз спустя длительное время после трансплантации, и в то же время должна обеспечиваться достаточная скорость приживления трансплантата.[11]

Сегодня отсутствует общепринятый стандартизированный протокол экспансии гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови *in vitro* с оптимальными комбинациями и концентрациями цитокинов.[12] Проводятся работы по поиску оптимальных условий для выделения чистой фракции CD34⁺ клеток при сохранении их пролиферативной активности и уменьшении степени дифференцировки. При правильно подобранных условиях культивирования гемопоэтических стволовых клеток (пуповинной крови) удастся добиться увеличения количества CD34⁺ клеток в 100-200 раз. Например, в работе 2013 года (Айзеншанд А. С. И др.) были объединены два различных метода культивирования ГСК ПК: в качестве фидерного слоя для ГСК с целью снижения степени дифференцировки CD34⁺ - клеток были использованы культуры МСК КМ; для улучшения пролиферативной активности клеток в состав ростовой среды добавляли цитокины (SCF, TPO, Flt3, IL3, IL6).[12]

После получения ПК, выделения лейкоцитарной фракции из ПК, получения МСК КМ, была проведена иммунномагнитная сепарация CD34⁺-клеток.[12]

Метод иммунномагнитной сепарации основан на использовании магнита MidiMACS Separator, колонок LS и антител к CD34⁺-клеткам согласно протоколу производителя (Miltenyi Biotec, Германия) для выделения чистой фракции CD34⁺-клеток из полученного лейкоконцентрата ПК. [12]

Экспансия CD34⁺-клеток проводилась таким образом: для поддержания пролиферативной активности ГСК использовали МСК КМ, среду IMDM, заменитель сыворотки BIT 9500 (все StemCellTechnologies, США) и цитокины: thrombopoietin (TPO), FMS-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt-3L), фактор стволовых клеток (SCF), IL3, IL6 (все Miltenyi Biotec, Германия).[12]

Выделенные после иммунномагнитной очистки клетки разбавляли в полной ростовой среде с добавлением цитокинов до концентрации 1×10^4 кл/мл и высевали на флаконы или планшеты с подложкой из МСК КМ с конфлюентностью 70-80%. Через 3 дня в культуральные сосуды добавляли трехкратный относительно изначального объем свежей ростовой среды. Культивирование проводили в течение 7-10 суток. [12]

Количественное определение $CD34^+$ -клеток после очищения ПК на иммуномагнитных колонках, было проведено непосредственно перед посевом и спустя неделю после начала культивирования и показало, что,

учитывая среднее содержание $CD34^+$ клеток $1,0 - 2,0 \times 10^6$ в одном образце ПК, в результате применения метода культивирования из него удалось получить около $7,0 - 25,0 \times 10^7$ клеток.[12]

Также было показано, что клетки, полученные в результате культивирования, не несут на себе маркеры дифференцировки и обладают высокой колониобразующей активностью. [12]

Приведенная методика культивирования ГСК является одной из многих существующих на сегодняшний день.

Заключение

В ходе работы была обобщена и систематизирована имеющаяся на данный момент информация по теме методов культивирования гемопоэтических стволовых клеток, которые используются при лечении онкогематологических заболеваний.

Как было показано, выделяют методы культивирования ГСК в жидкой культуре и сокультивирование с клетками стромы, каждый из которых обладает своими особенностями.

Основным параметром, отвечающим за исход лечения считают количество трансплантируемых ГСК. Все прогрессивные технологии культивирования направлены на экспансию гемопоэтических стволовых клеток, т.е. на увеличение их количества. Это достигается, в основном, добавлением к питательной среде цитокинов и фидерных клеток.

В целом, разработка новых технологий культивирования гемопоэтических стволовых клеток является перспективным направлением на стыке медицины, иммунологии и биотехнологии, которая будет иметь широкое практическое применение.

Список использованных информационных источников

1. Краткая Медицинская Энциклопедия — Петровский Б.В., 1984
2. Патологическая анатомия. Курс лекций. Под ред. В. В. Серова, М. А. Пальцева. — М.: Медицина, 1998.
3. Стволовые клетки : учеб.-метод. пособие / Н. И. Мезен, З. Б. Квачева, Л. М. Сычик. — 2-е изд., доп. — Минск : БГМУ, 2014. — 62 с.
4. Клиническая онкогематология: Руководство для врачей / Под ред. М.А.Волковой. — М.: Медицина, 2001. — 576 с.
5. ФГБУ «НМХЦ им. Н.И. Пирогова» , 2017. URL : <http://www.pirogov-center.ru/specialist/diseases/detail.php?ID=562>
6. Википедия, банк стволовых клеток пуповинной крови, URL: https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D0%B0%D0%BD%D0%BA_%D0%BF%D1%83%D0%BF%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D0%BD%D0%BD%D0%BE%D0%B9_%D0%BA%D1%80%D0%BE%D0%B2%D0%B8
7. Иммунология - Ярилин А. А., ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 747 с.
8. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у взрослых с онкологическими и гематологическими заболеваниями – инструкция по применению; Учреждение-разработчик: Республиканский центр гематологии и трансплантации костного мозга; Авторы: д-р мед. наук А.Л. Усс, канд. мед. наук Н.Ф. Миланович, Н.С. Соловьева, канд. мед. наук В.А. Змачинский, канд. мед. Наук П.Б. Мицкевич, И.Л. Завгородняя, З.Е. Батан, В.Н. Смольникова , 2003 г. — 25 с.
9. Анисимов С. В. 2012. Ксеногенные риски в применении стволовых клеток. Цитология. 54 (4): 289-297.
10. http://www.sartogosm.ru/pitatelnye_sredy_dlya_kultivirovaniya_gemopoeticheskikh_stvolovyh_kletok.html
11. Возможности экспансии гемопоэтических стволовых клеток in vitro, Р. И. Дмитриева¹, С. В. Анисимов^{1,2}
 1. - Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова;
 2. - Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 2013, с. 11-15.
12. Инновационные подходы и культивирование гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови для трансплантации в онкологии

1. - НИЛ клеточных технологий Северо-Западного
Государственного Университета имени И.И. Мечникова, Россия
2. - Покровский банк стволовых клеток, Россия

Айзенштадт А.С.^{1,2}, Багаева В.В.², Хрупина А.С.^{1,2}, Смирнова С.А.^{1,2},
Иволгин Д.А.^{1,2}, Жаров Е.В.², Смолянинов А.Б.^{1,2}, 2013, с. 40-43.