

УДК 57.085.2

**ОБОГАЩЕНИЕ CD271 НЕ УЛУЧШАЕТ ВЫДЕЛЕНИЕ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК
ИЗ G-CSF-МОБИЛИЗОВАННОЙ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ#**

© 2013 г. Iman Ahrari^{1,2}, Armin Attar^{1,2,3*}, Nima Pourhabibi Zarandi^{1,2}, Maryam Zakerinia⁴,
Mohsen Khosravi Maharlooei^{1,2}, Ahmad Monabati⁵

¹Student Research Committee, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

²Cell and Molecular Medicine Club, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

³Department of Cardiovascular Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

⁴Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology Division, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

⁵Department of Pathology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Поступила в редакцию 31.10.2012 г.

Принята к печати 18.02.2013 г.

Данные о выделении мезенхимальных стромальных (стволовых) клеток (МСК) из периферической крови, мобилизованной гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (G-CSF) с использованием обычных методов культивирования клеток, спорны и противоречивы. Методы обогащения, такие как выделение CD133-положительной фракции клеток, увеличивают процент успеха. CD271 – это известный маркер для выделения MSC из костного мозга. В проведенном исследовании мы выяснили, можно ли, используя обогащение CD271, достичь большего выхода при выделении MSC из G-CSF-мобилизованной периферической крови. Пять образцов G-CSF-мобилизованной периферической крови были собраны с контейнеров, оставшихся после трансплантации костного мозга. Пять образцов костного мозга использованы в качестве контроля. Из того и другого источника отобрали мононуклеарные клетки (МНК), которые затем подвергали магнитной сортировке для получения фракции CD271-положительных клеток. Выделенные клетки культивировали, а затем с помощью проточной цитометрии и анализа дифференцировочного потенциала определяли, соответствуют ли они характеристикам MSC. Оказалось, что CD271-положительная порция G-CSF-мобилизованной периферической крови не дала ожидаемого результата, в то время как клетки, выделенные из костного мозга, успешно формировали колонии MSC. Хотя по содержанию CD271⁺-клеток образцы МНК из костного мозга и из G-CSF-мобилизованной периферической крови не различались, в CD271-положительной фракции, выделенной из G-CSF-мобилизованной периферической крови, уровень гемопоэтических маркеров CD45, CD34 и CD133 был выше, чем в МНК из костного мозга. В результате показано, что обогащение CD271 не влияет на результаты процедуры выделения MSC из G-CSF-мобилизованной периферической крови. В этом источнике большинство всех CD271⁺-клеток имеют гемопоэтическое происхождение, а частота встречаемости MSC настолько низка, что, по-видимому, почти все они теряются в процессе выделения. В этом и заключается причина неудач.

Ключевые слова: CD271, мезенхимальные стромальные клетки, мезенхимальные стволовые клетки, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, мобилизованная периферическая кровь.

CD271 ENRICHMENT DOES NOT HELP ISOLATING MESENCHYMAL STROMAL CELLS FROM G-CSF-MOBILIZED PERIPHERAL BLOOD by Iman Ahrari^{1,2}, Armin Attar^{1,2,3*}, Nima Pourhabibi Zarandi^{1,2}, Maryam Zakerinia⁴, Mohsen Khosravi Maharlooei^{1,2}, Ahmad Monabati⁵ (¹Student Research Committee, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran; *e-mail: attarar@sums.ac.ir; ²Cell and Molecular Medicine Club, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran; ³Department of Cardiovascular Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran; ⁴Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology Division, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran; ⁵Department of Pathology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.). Reports on the isolation of mesenchymal stromal cells (MSCs) from granulocyte colony stimulating factor mobilized peripheral blood (G-CSF-mobilized PB) using regular culturing techniques are controversial. Enrichment techniques such as CD133 isolation have increased

Принятые сокращения: G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор; МНК – мононуклеарные клетки; MSC – мезенхимальные стромальные клетки; APC – аллофикоцианин.

Текст представлен авторами на английском языке.

* Эл. почта: attarar@sums.ac.ir

the success rates. CD271 is a well-known marker for enrichment of MSCs from bone marrow (BM). In the present study, we aimed to find out whether CD271 enrichment can help isolation of MSCs from G-CSF-mobilized PB. Five G-CSF-mobilized PB samples were collected from the remnant parts of the bags used for BM transplantation. Five BM samples were used as the control. Mononuclear cells (MNCs) from both resources were collected and underwent magnetic sorting for CD271-positive cells. The isolated cells were cultured, undergoing flowcytometry and differentiation assays to determine if they fulfill MSCs characteristics. CD271-positive portion of G-CSF-mobilized PB did not yield any cell outgrowth but the BM counterpart could successfully form MSC colonies. Although the percentage of CD271⁺ cells showed no difference between BM-MNCs and G-CSF-mobilized PB-MNCs, hematopoietic markers such as CD45, CD34 and CD133 composed a higher percentage of CD271-positive cells in the G-CSF-mobilized PB group. Results obtained indicated that CD271 enrichment does not help isolation of MSCs from G-CSF-mobilized PB. In this source, almost all of the CD271⁺ cells are from hematopoietic origin and the frequency of MSCs is so low that possibly during the process of cell isolation most of them are lost and the isolation fails.

Keyword: CD271, mesenchymal stromal cell, mesenchymal stem cell, granulocyte colony-stimulating factor, mobilized peripheral blood.

DOI: 10.7868/S0026898413050054

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК), ранее называемые мезенхимальными стволовыми клетками, — это мультипотентные клетки, характеризующиеся легкостью культивирования *in vitro* и обладающие способностью дифференцироваться в различные типы клеток, такие как адипоциты, остеоциты, хондроциты, гепатоциты и нейральные клетки [1]. Эти клетки можно получить из разных источников, например, из жировой ткани [2], пуповины [3] или пульпы зуба [4], но основным источником для выделения МСК служит костный мозг. Показано, что клетки из разных источников обладают разными способностями к росту и возможностями дифференцировки. Также имеются некоторые данные о выделении МСК из периферической крови, однако лишь в следовых количествах [5]. Наши знания о МСК периферической крови очень ограничены. Не вполне ясны их происхождение и дальнейшая судьба. Кроме того, основное препятствие — это очень низкое содержание МСК в периферической крови [6].

Как правило, в периферической крови можно обнаружить лишь следовые количества гемопоэтических стволовых клеток, если же их много, то такое состояние считается отклонением от нормы. Однако гемопоэтические стволовые клетки могут мигрировать в периферическую кровь при некоторых воздействиях. Один из способов, обычно используемых для перевода (мобилизации) гемопоэтических стволовых клеток из костного мозга в периферическую кровь, — введение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF). Может ли G-CSF подобным же образом вызывать мобилизацию МСК, пока непонятно. В одних исследованиях выявлена миграция МСК из костного мозга в систему периферического кровообращения под воздействием G-CSF [5], в других нет. Так, Вилларон (Villaron) и др. [7] показали, что после трансплантации костного мозга с G-CSF-транс-

плантатами в периферической крови пациента присутствуют МСК, происходящие от реципиента; тогда как другие авторы [8, 9] приводят противоположные результаты, утверждая, что некоторые мультипотентные клетки, сходные с МСК костного мозга и обнаруживаемые после трансплантации в периферической крови, происходят от донора. Лунд (Lund) и др. [5] показали, что G-CSF-мобилизованная периферическая кровь содержит малые количества фибробластоподобных клеток, которые способны формировать колонии наподобие МСК (эти клетки называются “колониеобразующие единицы фибробластов”, КОЕ-Ф или CFU-F). Однако в других работах изоляция МСК из G-CSF-мобилизованной периферической крови едва удавалась. В этих случаях низкий выход, возможно, обусловлен неверно выбранной методологией выделения, очистки и культивирования МСК [6]. Кэссис (Kassis) и др. [10] наблюдали, что из образцов мобилизованной периферической крови взрослых здоровых доноров, получавших G-CSF, можно выделить веретенообразноподобные клетки при помощи фибриновых микрошариков. Эти клетки могут экспрессировать поверхностные маркеры МСК, а также дифференцироваться в остеобласты, хондроциты и клетки жировой ткани (адипоциты), в то время как число клеток, прикрепляющихся к пластику, было незначительным во всех образцах. Другая группа исследователей использовала метод положительной селекции для выделения МСК из G-CSF-мобилизованной периферической крови, на этот раз с использованием маркера CD133 [11].

Квайрици (Quirici) с соавт. [12] показали, что антитела к низкоаффинному рецептору фактора роста нервов (low-affinity nerve growth factor receptor, LNRF, также называемому CD271, который относится к низкоаффинным рецепторам нейротрофинов и к суперсемейству рецепторов фактора

некроза опухоли) способны окрашивать МСК костного мозга. Изолированные CD271⁺ МСК костного мозга обладали большими пролиферативными способностями в сравнении с МСК, выделенными методом адгезии на пластике. Сейчас CD271 считается важным маркером, используемым для получения обогащенных МСК фракций костного мозга [13]. В проведенной работе мы попытались получить МСК из G-CSF-мобилизованной периферической крови путем выделения CD271-положительных клеток.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Сбор образцов G-CSF-мобилизованной периферической крови. Процесс мобилизации крови представляет собой введение инъекций G-CSF (Neupogen®, “Amgen Inc.”, США) из расчета 10 мг/кг в течение 5 сут. После этого мононуклеарные клетки (МНК) отделяли от полиморфноядерных клеток и собирали с использованием клеточно-го сепаратора (COBE Spectra Apheresis System с программным обеспечением версии 6.1 PBSC, Gambro BCT, “Lakewood”, США).

Пять образцов для исследования получали из отходов, остающихся после процедуры трансплантации стволовых клеток из периферической крови. Использование в исследовательских целях образцов из отходов человеческого происхождения — без установления личности донора и без исследований или манипуляций с ДНК — одобрено Комитетом по медицинской этике Ширазского университета (Shiraz University of Medical Sciences' Ethics Committee).

Подготовка МНК из G-CSF-мобилизованной периферической крови для выделения МСК. Образцы G-CSF-мобилизованной периферической крови промывали и центрифугировали в течение 10 мин при 300 × g. Клеточный дебрис удаляли, 10⁷ клеток ресуспендировали в свежей среде, а затем непосредственно культивировали либо использовали для проточной цитометрии. Другие 10⁷ клеток использовали для выделения CD271-положительной фракции с дальнейшим культивированием либо анализом методом проточной цитометрии.

Получение образцов костного мозга. Пять образцов костного мозга объемом 2–3 мл, с добавлением антикоагулянта гепарина, получены от пациентов, прошедших диагностическую аспирацию костного мозга, после получения документально подтвержденного согласия. Культуры образцов с нормальными результатами были включены в настоящее исследование.

Выделение МНК из костного мозга. Костный мозг помещали в LymphoSep (1.077 г/мл, “Biosera, Ringmer”, Великобритания) и центрифугировали при 450 × g в течение 25 мин. Затем МНК выделя-

ли из светлого слоя кровяного сгустка. Из половины полученных МНК выделяли CD271-положительную фракцию для дальнейшего культивирования или проточной цитометрии, а другую половину использовали для непосредственного культивирования.

Магнитная сепарация МНК по маркеру CD271. Полученные МНК из обоих источников прежде всего очищали от мертвых клеток, используя для этого специальный набор (“Miltenyi Biotec GmbH”, Германия), чтобы снизить вероятность неспецифического связывания антител.

Магнитная сепарация клеток была нацелена на выделение клеток CD271⁺. МНК сначала помечали аллофикоцианином (APC), конъюгированным с антителами к CD271 (“Miltenyi Biotec GmbH”, Германия), для чего 10 мкл антител добавляли к 100 мкл суспензии клеток и инкубировали в холодном темном месте в течение 10 мин. Затем целевые клетки связывали с микрошариками, конъюгированными с анти-APC антителами (“Miltenyi Biotec”), используя 20 мкл антител на 80 мкл суспензии клеток и инкубируя смесь в холодном темном месте в течение 30 мин. Суспензию клеток наносили на разделительную колонку магнитного сепаратора MACS. Меченные магнитными микрошариками клетки CD271⁺ задерживались на колонке, в то время как немеченые клетки оказывались в проскоке. Разделенные таким образом клетки использовали на следующих этапах исследования.

Культивирование выделенных клеток. МНК, CD271-положительные и отрицательные клетки костного мозга либо G-CSF-мобилизованной периферической крови помещали в культуральные флаконы без белкового покрытия в среду α-MEM, содержащую 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 4 мМ GlutaMAX, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (все реагенты фирмы “Gibco/Invitrogen”, США), и культивировали в течение 72 ч при 37°C в 5% CO₂ при 90%-ной влажности. Неприкрепившиеся клетки и дебрис удаляли, а к прикрепленным клеткам добавляли свежую порцию среды. Среду меняли два раза в неделю до тех пор, пока не происходило слияние клеток или не прекращался их рост в течение 14 сут наблюдения. Клетки пересевали, выращивали до 80%-ной конfluence, затем снимали обработкой трипсин-ЭДТА (“Gibco/Invitrogen”) и пересевали на новые флаконы. Клетки пересевали трижды, после чего использовали для дальнейших экспериментов, включая анализ дифференцировки и исследование методом проточной цитометрии.

Проточная цитометрия. Спектр поверхностных маркеров МНК из костного мозга и G-CSF-мобилизованной периферической крови анализировали в не менее чем 10⁶ клеток, используя метод проточной цитометрии, стандартизованный для

анализа редко встречающихся клеток. Мертвые клетки исключали с помощью красителя пропидий йодида (“Miltenyi Biotec”). Клетки инкубировали 10–30 мин в темноте со следующими мечеными антителами против клеточных маркеров человека: CD90-APC, CD271-фикоэритрин (PE), CD271-флуоресцеин изотиоцианат (FITC), CD271-APC, MSCA1-APC, CD34-FITC, CD133-PE, CD56-PE, CD45-перидининхлорофилл протеин (PerCP) (все “Miltenyi Biotec”) и CD146-FITC (“BD Biosciences”, США).

Спектр поверхностных клеточных маркеров в популяции прикрепившихся к культуральному флакону клеток анализировали после третьего пересева, снимая клетки 0.25%-ным раствором трипсина с ЭДТА. Трипсин нейтрализовали ФБС-содержащей средой, клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером и инкубировали 10–30 мин в темноте со следующими антителами: CD90-FITC, CD105-PE (“AbD Serotec”, Великобритания), CD14-PE, CD34-FITC, CD166-PE, CD45-FITC, CD44-PE, CD73-PE (“BD Biosciences”).

Мышьиные IgG1-PE, IgG1-APC, IgG2a-FITC (“AbD Serotec”), IgG2a-PerCP, IgG2b-FITC и IgG2a-PE (“Miltenyi Biotec”) использовали как контроль изотипа антител. Клетки анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACS-Calibur. Данные обрабатывали с использованием программного обеспечения WinMDI.

Остеогенная дифференцировка МСК. Для индукции остеогенной дифференцировки МСК после третьего пересева снимали 0.25%-ным трипсином с ЭДТА. Клетки выращивали в среде NH-osteodiff Medium (“Miltenyi Biotec”) при плотности 3×10^4 клеток/мл в двухкамерных культуральных слайдах (“BD Biosciences”) в течение 3 недель согласно инструкции, дважды в неделю меняя среду на свежую. Для подтверждения дифференцировки после определенных морфологических изменений клетки анализировали с помощью окрашивания ализарином красным. Для окрашивания клетки промывали один раз PBS, фиксировали метанолом в течение 10 мин и инкубировали в растворе 0.1 М ализарина красного (“Sigma”, США) в 25%-ном растворе аммиака в течение 24 ч, после чего однократно промывали клетки дистиллированной водой.

Адипогенная дифференцировка. Для индукции адипогенной дифференцировки клетки после третьего пересева снимали, как описано выше, и выращивали в среде MesenCult с добавлением компонентов, стимулирующих адипогенез (10% adipogenic stimulatory supplements, среда и компоненты фирмы “Stem Cell Technologies”, Канада), при плотности 1.5×10^4 клеток/мл в двухкамерных культуральных слайдах согласно инструкции производителя. Клетки выращивали в течение 3 недель, заменяя половину среды на свежую пор-

цию в случае, если среда приобретала желтый цвет. После того, как клетки приобретали характерные морфологические признаки, их проанализировали с помощью окрашивания Oil-red O. Для окрашивания клетки фиксировали 4%-ным формалином с добавлением 1%-ного хлорида кальция в течение часа. После этого клетки выдерживали в растворе Oil-red O в течение 10–15 мин, проводили контрастирование обработкой 70%-ным этанолом в течение минуты и промывали дистиллированной водой.

Статистический анализ. Для статистической обработки данных использовали программное обеспечение SPSS версии 19.0 для Windows (“IBM”, США). Полученные результаты оценивали с помощью критерия Краскела–Уоллиса и точного критерия Фишера. Значение $p < 0.05$ рассматривалось как статистически значимое.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика клеточных культур

Изначально посеянные МНК из G-CSF-мобилизованной периферической крови различались как по внешнему виду, так и по размерам (рис. 1а). С течением времени многие клетки погибали и, что интересно, некоторые из клеток овальной или вытянутой формы имели видимые границы, другие клетки имели цитоплазматические расширения, а иногда и несколько ядер (рис. 1б). Эта картина напоминает остеокластоподобные клетки, загрязняющие культуры МСК пуповинной крови [14]. В противоположность этим клеткам, МНК костного мозга формировали типичные веретеновидные фибробластоподобные клетки во всех 5 образцах, за исключением нескольких округлых клеток (рис. 1в). Эти фибробластоподобные клетки формируют однородные колонии, которые достигают фазы слияния на 15–21 сут (рис. 1г).

Все CD271-отрицательные клеточные культуры, полученные как из G-CSF-мобилизованной периферической крови, так и из костного мозга, обладали одинаковым свойством – отсутствием растущих клеток спустя 1 месяц (рис. 1д–з). CD271⁺-клетки, выделенные из G-CSF мобилизованной периферической крови, после первого посева отличались как по внешнему виду, так и по размерам (рис. 1и). Через 4 недели большая часть клеток погибла, образования колоний не наблюдалось (рис. 1к). CD271-положительные клетки, выделенные из костного мозга, спустя 2 сут после первого посева представляли собой прикрепленные веретеновидные клетки (рис. 1л). Эти клетки быстро росли в течение 5–6 сут, формируя однородные колонии, которые покрывали дно флакона за 15 сут (рис. 1м).

Таким образом, из культур всех пяти образцов G-CSF-мобилизованной периферической крови

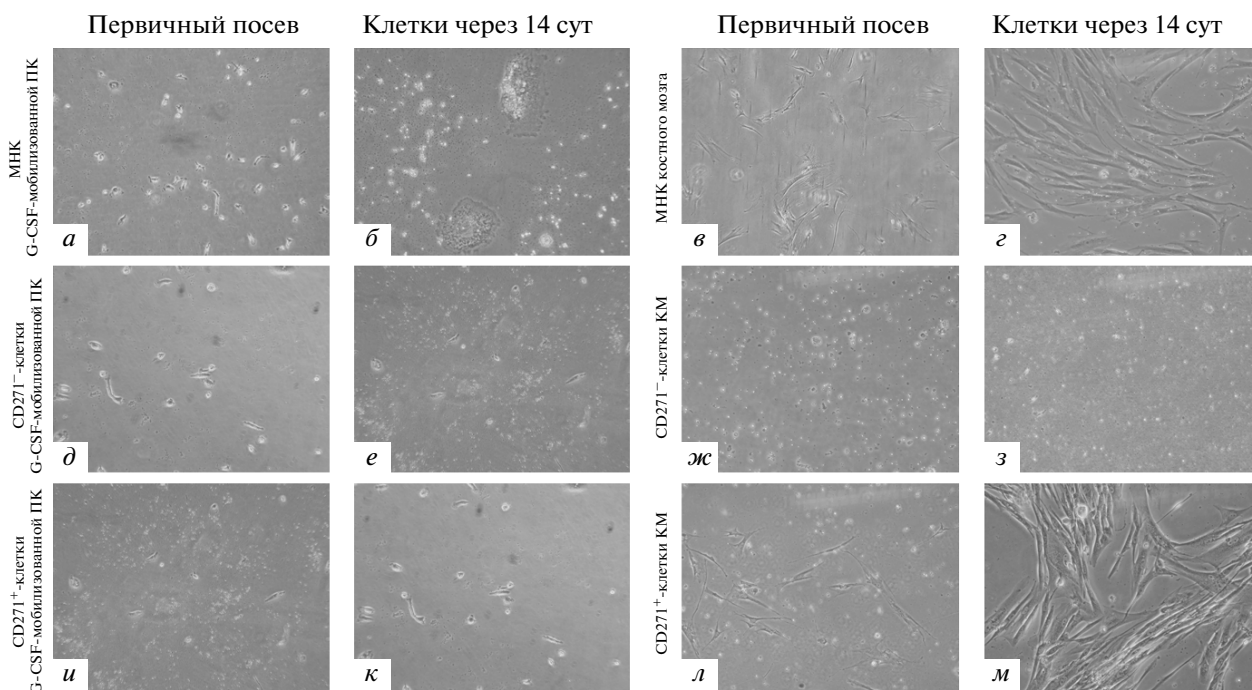


Рис. 1. Характеристика клеточных культур. *а* – Первоначально засеянные МНК G-CSF-мобилизованной периферической крови (ПК) имели округлую форму, но были неоднородны как по контурам, так и размерам; *б* – по прошествии месяца многие клетки погибли, но, что любопытно, некоторые приобрели овальную либо вытянутую форму и видимые границы, в некоторых из них заметно расширена цитоплазма, а иногда видно несколько ядер. *в* – Культивируемые МНК костного мозга образуют типичные веретеновидные фибробластоподобные клетки; *г* – они формируют однородные колонии, которые сливаются на 15–21 сут. *д* – CD271⁻-клеточные культуры из G-CSF-мобилизованной ПК; *е* – через 1 месяц в этих клеточных линиях роста не наблюдается. *ж* – Выделенные из костного мозга CD271⁻-клетки не дают фибробластоподобных клеток после первого посева, *з* – так же как и через месяц. *и* – Выделенные из G-CSF-мобилизованной ПК CD271⁺-клетки после первого посева неоднородны по форме и размеру; *к* – через 4 недели большинство этих клеток погибает. *л* – Выделенные из костного мозга CD271⁺-клетки через двое суток после первого посева формируют прикрепленные веретеновидные клетки; *м* – клетки быстро растут 5–6 сут и образуют однородные колонии, которые покрывают дно флакона за 15 сут. Обозначения: ПК – периферическая кровь; КМ – костный мозг.

всех трех ранее обозначенных категорий не удалось вырастить МСК. В противоположность этому результату, все пять образцов как выделенных из костного мозга CD271-положительных клеток, так и МНК костного мозга, формировали типичные культуры МСК ($p = 0.008$). Выделенные из костного мозга CD271-отрицательные клетки были не способны формировать КОЕ-Ф (табл. 1).

Анализ дифференцировки

Адипогенная дифференцировка клеток культур, способных к формированию КОЕ-Ф, подтверждена как морфологически, так и по результатам окрашивания. Спустя неделю после посева на адипогенную среду в клетках обнаруживали небольшие отдельные вакуоли, размер и количество которых увеличивались с течением времени.

Таблица 1. Выделение мезенхимальных стромальных клеток из различных источников

Источник	Успешно выделенные/общее число выделений (%)
МНК G-CSF-мобилизованной периферической крови	0/5 (0%)
МНК костного мозга	5/5 (100%)
CD271 ⁺ -клетки G-CSF-мобилизованной периферической крови	0/5 (0%)
CD271 ⁺ -клетки костного мозга	5/5 (100%)
CD271 ⁻ -клетки G-CSF-мобилизованной периферической крови	0/5 (0%)
CD271 ⁻ -клетки костного мозга	0/5 (0%)

Все они окрашивались красителем масляным красным Oil-red O.

Самым ранним признаком дифференцировки МСК в остеобласты считается осаждение межклеточного матрикса вокруг клеток на вторую неделю после посева. Полная дифференцировка в остеобласты заняла 3 недели. Минерализация подтверждена с помощью окрашивания ализарином красным.

Результаты проточной цитометрии

Данные проточной цитометрии по анализу МНК как из G-CSF-мобилизованной периферической крови, так и из костного мозга, до и после разделения по маркеру CD271, представлены в табл. 2. Проточно-цитометрический анализ фибробластоподобных клеток, полученных из культур, производных костного мозга, показал, что эти клетки положительны по мезенхимальным маркерам, таким как CD73 ($98.68 \pm 1.24\%$), CD105 ($97.66 \pm 1.93\%$), CD44 (100%), CD166 ($99.88 \pm 0.1\%$), CD90 ($89.28 \pm 10.31\%$), и отрицательны по гемопоэтическим антигенам, таким как CD45 ($1 \pm 0.87\%$), CD34 ($0.91 \pm 0.62\%$) и CD14 ($0.47 \pm 0.21\%$) (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами была предпринята попытка выделить мезенхимальные стволовые клетки из G-CSF-мобилизованной периферической крови, используя современные технологии магнитной сортировки клеток и их культивирования. Выделенные клетки охарактеризованы методами проточной цитометрии и анализа дифференцировки с использованием МСК костного мозга в качестве контроля.

Присутствие МСК в костном мозге и других источниках, таких как плацента и пуповинная кровь, — подтвержденный факт [14, 15], но высокоэффективной, хорошо воспроизводимой технологии получения МСК из периферической крови пока нет [6]. Несмотря на сообщение одной группы авторов об успешном выделении МСК из периферической крови [16], двум другим не удалось получить даже по одной колонии растущих МСК от здоровых доноров [17, 6], а в еще одном исследовании только в двух случаях из десяти удалось выделить МСК [18]. В основном, выход МСК при выделении из периферической крови очень низкий, а зачастую вовсе отсутствует [19, 20]. Кроме того, поддерживать МСК периферической крови в культуре также сложно [6].

Когда обнаружили факты, свидетельствующие о мобилизации МСК из костного мозга в периферическую кровь под воздействием G-CSF [7], G-CSF-мобилизованную периферическую кровь стали рассматривать как новый возможный источник МСК. Последующие исследования показали, что в образцах G-CSF-мобилизованной периферической крови присутствуют фибробластоподобные клетки с набором поверхностных маркеров, характерных для МСК. Лунд (Lund) с коллегами выделили клетки, положительные по некоторым маркерам, таким как CD13, CD29, CD105 и CD166, и отрицательные по CD14, CD34, CD45 и CD133. Однако оказалось, что содержание этих клеток очень мало (0.0002%). К тому же, МСК мобилизованной периферической крови имели ограниченные возможности роста и старели спустя 20–25 сут после выделения [5]. Фернандес (Fernández) и соавт. [17] заявили об успешном выделении МСК из G-CSF-мобилизованной периферической крови у 11 из 14 пациентов с раком молочной железы; однако попытки

Таблица 2. Экспрессия различных поверхностных клеточных маркеров в исследуемых клеточных популяциях*

Популяция клеток	CD271	CD45	CD56	MSCA1	CD146	CD90	CD34	CD133
МНК костного мозга	1.59 ± 0.46	79.82 ± 5.72	3.17 ± 0.58	0.22 ± 0.1	2.56 ± 0.45	0.29 ± 0.22	1.86 ± 0.2	1.46 ± 0.2
CD271 ⁺ -клетки костного мозга	89.07 ± 1.2	53.81 ± 17.64	49.17 ± 2.7	1.65 ± 0.3	34.62 ± 0.5	10.51 ± 2.1	21.03 ± 1.3	15.08 ± 0.3
МНК G-CSF-мобилизованной периферической крови	1.5 ± 0.5	94.64 ± 1.02	12.49 ± 1.76	2.54 ± 0.4	1.12 ± 0.34	1.73 ± 0.2	5.16 ± 0.6	4.89 ± 0.2
CD271 ⁺ -клетки G-CSF-мобилизованной периферической крови	88.26 ± 1.25	97.11 ± 0.4	94.79 ± 4.56	2.37 ± 0.2	44.23 ± 2.3	39.98 ± 1.5	69.3 ± 2.5	60.85 ± 2.1

* Данные проточной цитометрии представлены в процентах анализируемых клеток.

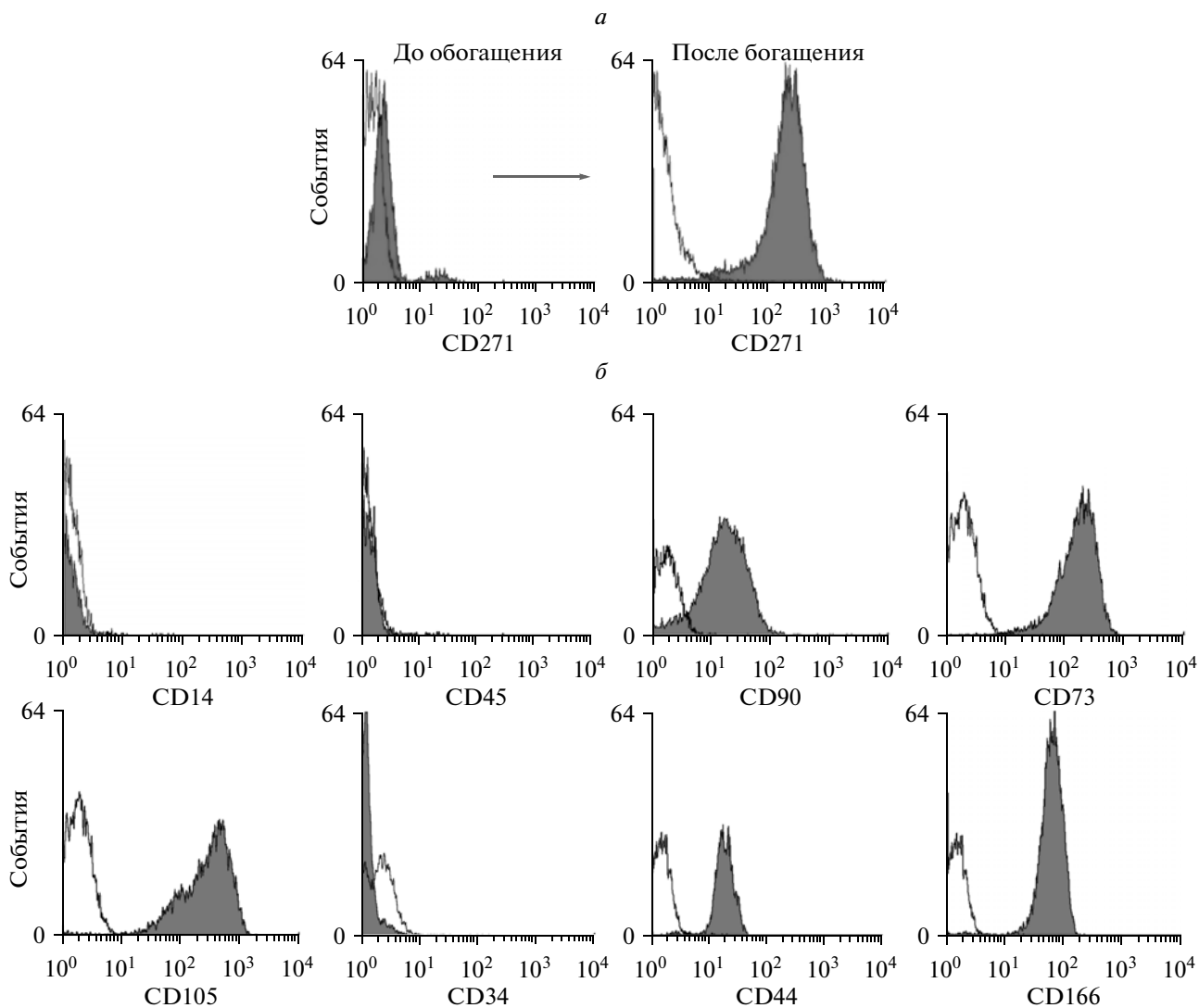


Рис. 2. Проточно-цитометрический анализ успешно выделенных МНК костного мозга. *a* – Содержание $CD271^{+}$ -клеток в МНК костного мозга – до и после обогащения. *б* – Антигенный паттерн фибробластоподобных колониобразующих клеток, выделенных из костного мозга.

выделения МСК из образцов, полученных от здоровых доноров, полностью провалились. Имеются данные о том, что некоторые модификации в методиках обогащения, например, последовательное удаление CD6 [21], использование методов, основанных на фибриновых микрошариках [10], или селекция на CD133 [11], могут улучшить результат выделения МСК из G-CSF-мобилизованной периферической крови здоровых доноров. Таким образом, появилась надежда, что иммуноселекция может привести к обогащению G-CSF-мобилизованной периферической крови мезенхимальными стромальными клетками [6]. Одним из возможных кандидатов для этой цели может быть CD271, который используется как маркер для выделения МСК из костного мозга [11]. Выделенные нами из всех образцов костного мозга $CD271^{+}$ -по-

ложительные клетки могли успешно формировать КОЕ-Ф с соответствующим набором поверхностных клеточных маркеров и дифференцировочным потенциалом, что полностью отвечает критериям определения МСК, которые сформулированы Международным обществом по клеточной терапии [22]. Тем не менее, в случае G-CSF-мобилизованной периферической крови образование колоний не наблюдали ни для $CD271$ -обогащенной порции, ни для необогащенных образцов ($p = 0.008$). Полученные результаты согласуются с уже имеющимися в литературе данными по $CD271$, подтверждая, что это действительно хороший маркер, пригодный для выделения МСК из костного мозга [12, 13]. Однако этот вывод не распространяется на G-CSF-мобилизованную периферическую кровь. Репертуар поверхностных маркеров $CD271^{+}$ -кле-

ток, выделенных из МНК костного мозга и G-CSF-мобилизованной периферической крови, различен. Хотя процент CD271⁺-клеток среди МНК костного мозга и G-CSF-мобилизованной периферической крови одинаков ($p = 0.9$), гемопоэтические маркеры, такие как CD45, представлены в большем количестве в G-CSF-мобилизованной периферической крови. Это справедливо и в отношении маркеров гемопоэтических стволовых клеток: CD34 и CD133. Таким образом, большинство CD271⁺-клеток G-CSF-мобилизованной периферической крови имеют гемопоэтическое происхождение и не относятся к МСК.

Практически полное отсутствие CD271-положительных МСК (и, видимо, любых МСК) в периферической крови означает, что мобилизация МСК из костного мозга не очень зависит от стимуляции G-CSF и находится под контролем других механизмов. Мобилизация МСК — это ключевой шаг в процессе зависимой от МСК репарации [23], которая включает в себя мобилизацию МСК из места их обычного размещения, миграцию в направлении поврежденных тканей и расположение там. Факторы, выделяемые тканями в случае повреждения или апоптоза, могут привлекать стволовые клетки в поврежденные участки, что в дальнейшем приводит к их пролиферации, дифференцировке и в конечном итоге замене поврежденных тканей [24, 25]. Существуют данные, что взаимодействие фактора стромальных клеток SDF-1 α и C-X-C хемокинового рецептора типа 4 (CXCR4) вызывает перемещение МСК. Кроме того, воспалительные цитокины, трансформирующий ростовой фактор β 1, интерлейкин-1 β и фактор некроза опухолей TNF- α могут усиливать экспрессию матриксных металлопротеиназ мезенхимальными стромальными клетками, что приводит к их миграции через внеклеточный матрикс [26]. Эти данные могут объяснить результаты, полученные Фернандес с соавт. [17], — им удалось выделить МСК из образцов G-CSF-мобилизованной периферической крови больных раком молочной железы в 11 случаях из 14, в то время как в случае здоровых доноров такое выделение не увенчалось успехом. Похоже, что мобилизация МСК обязательно вызывается G-CSF и, что более вероятно, происходит под воздействием хемокинов, характерных для патологического статуса больных раком молочной железы и отсутствующих в крови здоровых людей. Можно заключить, что нет убедительных доказательств связи между МСК периферической крови и процедурой лейкофереза или солидными опухолями [6], так как имеются сообщения и об успешном [5, 17], и о безуспешном [19, 20, 27] обнаружении МСК в периферической крови в таких условиях. Кроме того, нами показано, что обогащение CD271 не влияет на результативность выделения МСК из G-CSF-мобилизованной перифериче-

ской крови — и связано это с тем, что в этом источнике практически все CD271⁺-клетки имеют гемопоэтическое происхождение, а частота встречаемости МСК настолько низка, что в процессе выделения большинство из них теряется.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом (номер 6208) Ширазского университета медицинских наук (Shiraz University of Medical Sciences). Авторы благодарят д-ра Nasrin Shokrgour из Центра развития клинических исследований больницы Немази (the Center for Development of Clinical Research of Nemazee Hospital) за помощь при редактировании статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vassaghi A., Dehghani A., Khademalhosseini Z., Maharlooeei M.K., Monabati A., Attar A. 2013. Parameters that influence the isolation of multipotent mesenchymal stromal cells from human umbilical cord blood. *Hematol. Oncol. Stem Cell Ther.* **6**, 1–8.
2. Ahrari I., Purhabibi Zarandi N., Khosravi Maharlooeei M., Monabati A., Armin A., Ahrari S. 2013. Adipose tissue derived multipotent mesenchymal stromal cells can be isolated using serum-free media. *Iran. Red Crescent Med. J.* **15** (in press). doi: 10.5812/ircmj.4506.
3. Attar A., Langeroudi A.G., Vassaghi A., Ahrari I., Maharlooeei M.K., Monabati A. 2013. Role of CD271 enrichment in the isolation of mesenchymal stromal cells from umbilical cord blood. *Cell Biol. Int.* (in press). doi: 10.1002/cbin.10117.
4. Eslaminejad M.B., Nazarian H., Shariati M., Vahabi S., Falahi F. 2010. Isolation and in vitro characterization of mesenchymal stem cells derived from the pulp tissue of human third molar tooth. *Iran J. Med. Sci.* **35**, 216–253.
5. Lund T.C., Tolar J., Orchard P.J. 2008. Granulocyte colony-stimulating factor mobilized CFU-F can be found in the peripheral blood but have limited expansion potential. *Hematologica.* **93**, 908–912
6. He Q., Wan C., Li G. 2007. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells.* **25**, 69–77.
7. Villaron E.M., Perez-Simon J.A., San Miguel J.F., del Canizo C. 2005. Bone marrow mesenchymal stem cells chimerism after allogeneic hematopoietic transplantation. *Exp. Hematol.* **33**, 605–611.
8. Villaron E.M., Almeida J., Lopez-Holgado N., Alcoceba M., Sanchez-Abarca L.I., Sanchez-Guido F.M. 2004. Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica.* **89**, 1421–1427.
9. Kristina B., Haifa A.A., Annette R., Christina F., Michael H., Manja K. 2009. Mesenchymal stem cells remain host-derived independent of the source of the stem-cell graft and conditioning regimen used. *Transplantation.* **87**, 217–221.
10. Kassis I., Zangi L., Rivkin R., Levdansky L., Samuel S., Marx G., Gorodetsky R. 2006. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral

- blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplant.* **37**, 967–976.
11. Tondreau T., Meuleman N., Delforge A., et al. 2005. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells.* **23**, 1105–1112.
 12. Quirici N., Soligo D., Bossolasco P., Servida F., Luminì C., Lambertenghi Deliliers G. 2002. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp. Hematol.* **30**, 783–791.
 13. Poloni A., Maurizi G., Rosini V., Mondini E., Mancini S., Discepoli G., Biasio S., Battaglini G., Felicetti S., Berardinelli E., Serrani F., Leoni P. 2009. Selection of CD271⁺ cells and human AB serum allows a large expansion of mesenchymal stromal cells from human bone marrow. *Cytotherapy.* **11**, 153–162.
 14. Erices A., Conget P., Minguell J. 2000. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br. J. Haematol.* **109**, 235–242.
 15. Miao Z., Jin J., Chen L., et al. 2006. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol. Int.* **30**, 681–687.
 16. Chong P.P., Selvaratnam L., Abbas A.A., Kamarul T. 2012. Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* **30**, 634–642.
 17. Fernández M., Simon V., Herrera G., Cao C., Del Favero H., Minguell J.J. 1997. Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant.* **20**, 265–271.
 18. Kuznetsov S.A., Mankani M.H., Gronthos S., Satomura K., Bianco P., Robey P.G. 2001. Circulating skeletal stem cells. *J. Cell Biol.* **153**, 1133–1140.
 19. Ojeda-Urbe M., Brunot A., Lenat A., Legros M. 1993. Failure to detect spindle-shaped fibroblastoid cell progenitors in PBPC collections. *Acta Haematol.* **90**, 139–143.
 20. Lazarus H.M., Haynesworth S.E., Gerson S.L., Caplan A.I. 1997. Human bone marrow derived mesenchymal (stromal) progenitor cells (MPCs) cannot be recovered from peripheral blood progenitor cell collections. *J. Hematother.* **6**, 447–455.
 21. Conrad C., Gottgens B., Kinston S., Ellwart J., Huss R. 2002. GATA transcription in a small rhodamine 123(low)CD34(+) subpopulation of a peripheral blood derived CD34–CD105(+) mesenchymal cell line. *Exp. Hematol.* **30**, 887–895.
 22. Horwitz E.M., Le Blanc K., Dominici M., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Deans R.J., Krause D.S., Keating A. 2005. International society for cellular therapy clarification of the nomenclature for MSC: the international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy.* **7**, 393–395.
 23. Karp J.M., Leng Teo G.S. 2009. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell.* **6**, 206–216.
 24. Gurtner G.C., Werner S., Barrandon Y., Longaker M.T. 2008. Wound repair and regeneration. *Nature.* **15**, 314–321.
 25. Li F., Huang Q., Chen J., Peng Y., Roop D.R., Bedford J.S., Li C.Y. 2010. Apoptotic cells activate the “phoenix rising” pathway to promote wound healing and tissue regeneration. *Sci. Signal.* **23**, ra13.
 26. Ries C., Egea V., Karow M., Kolb H., Jochum M., Neth P. 2007. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood.* **109**, 4055–4063.
 27. Wexler S.A., Donaldson C., Denning-Kendall P., Rice C., Bradley B., Hows J.M. 2003. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal ‘stem’ cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br. J. Haematol.* **121**, 368–374.