



© Э. К. Айламазян, Д. А. Ниаури,
А. М. Гзгзян, Л. Х. Джемлиханова,
Е. О. Усолицева

ОПЫТ ПОЛУЧЕНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ МЕНСТРУАЛЬНОЙ КРОВИ

ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта»
СЗО РАМН,
Санкт-Петербург, Россия

УДК: 612.662:611.018.1

■ В статье описывается технология выделения стволовых клеток из менструальной крови и приводится характеристика выделенной линии стволовых клеток.

■ **Ключевые слова:** стволовые клетки; эндометриальные стволовые клетки; культивирование стволовых клеток; мультипотентность.

Введение

В последние годы в терапии многих заболеваний, в том числе неизлечимых прежде, открываются новые перспективы благодаря технологиям клеточной терапии [8, 13, 21, 24, 28, 32]. Стволовые клетки — это недифференцированные клетки-предшественницы, способные развиваться при определенных условиях в клетки практически любых тканей взрослого организма. Именно это фундаментальное свойство стволовых клеток успешно используется в клинической практике уже около 40 лет [18, 19, 27].

Важным для практического применения является деление стволовых клеток по происхождению на эмбриональные и соматические. Эмбриональные стволовые клетки плюрипотентны, т. е. способны развиваться в клетки-производные любого зародышевого листка. По своим пролиферативным характеристикам эмбриональные стволовые клетки превосходят любые другие [3]. Главными недостатками эмбриональных стволовых клеток является их генетическая нестабильность в культуре и доказанная онкогенность [10, 16]. Соматические стволовые клетки обнаруживаются во многих тканях взрослого организма и по способности к дифференцировке являются уни- или мультипотентными (однаправленными или способными развиваться в клетки разных типов в пределах одного зародышевого листка). Преимуществами соматических стволовых клеток являются более доступные источники их получения, меньший онкогенный потенциал, возможность аутодонорства клеток.

В настоящее время существуют отработанные схемы по выделению субпопуляций стволовых клеток из разных тканей, их культивированию *in vitro* в целях экспансии клеточного материала, а также коррекции их дифференцировки в заданном направлении.

Эндометриальные стволовые клетки исследуются с 2004 года [9, 15]. В 2007 году стволовые клетки эндометрия были выделены из менструальной крови, что дало новый толчок к их изучению [11, 22, 23]. По своим характеристикам эндометриальные стволовые клетки относятся к клеткам с преобладанием свойств мезенхимальных стволовых клеток [6, 15]. В настоящее время исследования стволовых клеток, выделенных из менструальной крови, направлены на поиск новых факторов, определяющих специфическую дифференцировку, и точек приложения терапевтического потенциала этих клеток.

Методика

Для получения клеточного продукта на основе стволовых клеток, выделенных из менструальной крови, нами использована методика, разработанная в Институте цитологии РАН [2, 4].

Забор менструальной крови производился у женщин репродуктивного возраста ($n = 5$) на 2–3 день менструального цикла. Перед процедурой забора менструальной крови проводилось комплексное обследование женщин с целью оценки состояния микробиоценоза половых путей и исключения персистенции инфекций, передающихся половым путем. Менструальную кровь собирали в асептических условиях с помощью урогенитального зонда типа С (внутриматочный Пайпель). Вакуум-аспирация содержимого полости матки проводилась при положении канюли зонда в области внутреннего зева шейки матки.

Полученный материал (1–2 мл от каждого донора) транспортировался при температуре 4 °С в фосфатно-солевом буфере PBS (Phosphate buffered saline; pH 7,4) с добавлением цитрата натрия и смеси антибиотик-антимикотик. После центрифугирования клеточный осадок ресуспензировался в PBS с добавлением смеси антибиотика и антимикотика и инкубировался в течение часа при температуре 37 °С. Далее клетки переносились в 6-см чашки Петри и культивировались в среде DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium : Nutrient Mixture F-12; Gibco, США), содержащей 10% бычьей эмбриональной сыворотки, 1% смеси антибиотика и антимикотика, 1% глутамакса. В ростовой среде часть клеток проявили повышенную способность к адгезии к поверхности культуральных сосудов; другие клетки удалялись при смене среды. Культуры с наибольшим количеством адгезивных клеток использовались для получения клеточных линий.

С целью криоконсервации стволовые клетки отделяли от поверхности культуральных емкостей с помощью 0,05% раствора трипсина с EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid; Gibco, Invitrogen, USA), помещали в культуральную среду и центрифугировали со скоростью 1750 об/мин в течение 5 мин. Далее клетки ресуспензировали в бычьей эмбриональной

сыворотке, содержащей 10% раствор DMSO (dimethylsulfoxide; Fluka, Buchs, Switzerland), переносили в криовials и замораживали в жидком азоте со скоростью 1 °С/мин с последующим хранением в жидком азоте. При размораживании ампулу с клетками быстро нагревали в водяной бане при 37 °С, по каплям добавляли теплую ростовую среду, переносили в пробирку и центрифугировали при 1750 об/мин в течение 5 мин. Отмытые от DMSO клетки сеяли во флаконы и культивировали на описанной среде DMEM/F12. Дальнейшие пересевы с целью изучения свойств клеток после криоконсервации также проводили с помощью смеси трипсин-EDTA 2 раза в неделю.

Для подтверждения принадлежности выделенных клеток к стволовым были определены их способности к пролиферации *in vitro* и экспрессии специфических клеточных маркеров, а также возможность к дифференцировке в различные клеточные типы.

Результаты исследования

Общепринято, что стволовые клетки эндометриального происхождения представляют собой неоднородный пул клеток, включающий в себя как эпителиальный, так и стромальный компоненты [14, 15]. В нашем исследовании клетки с повышенными адгезивными свойствами, выделенные из менструальной крови, на ранних этапах культивирования морфологически были представлены гетерогенной популяцией клеток, состоящей из фибробластоподобных клеток и эпителиальных клеток (рис. 1). При последующих пассажах селективным преимуществом обладали фибробластоподобные (стромальные) клетки (рис. 2).

Основной характеристикой стволовых клеток и, соответственно, критерием, определяющим принадлежность к стволовым клеткам, является пролиферативный потенциал [5]. Выделенные нами клетки характеризуются высокой скоростью пролиферации: время удвоения в экспоненциальной

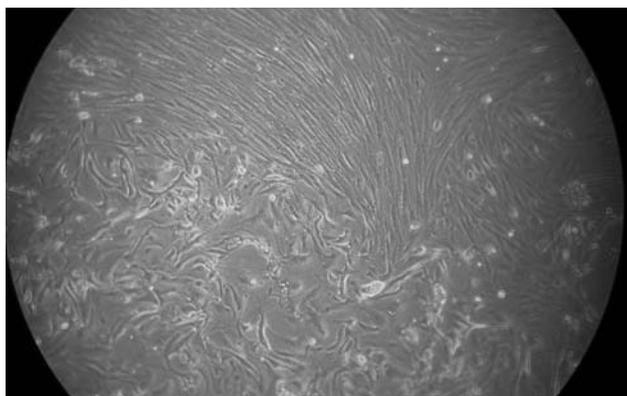


Рис. 1. Первичная культура эндометриальных стволовых клеток

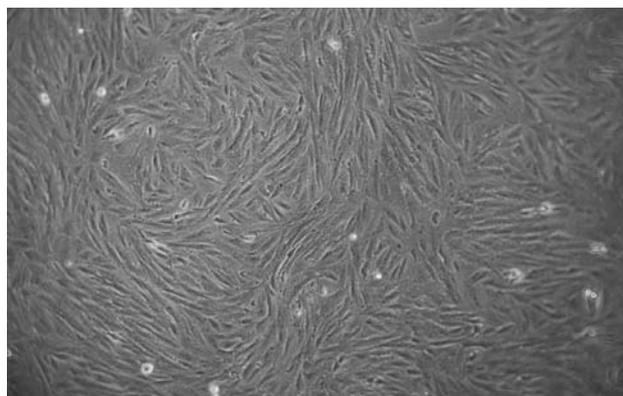


Рис. 2. Культура эндометриальных стволовых клеток после второго пассажа

фазе роста составило 22–23 ч. Старение культуры соматических стволовых клеток происходит по истечению определенного, специфичного для каждого вида стволовых клеток количества удвоений. Процесс старения проявляется в виде замедления пролиферации и нередко спонтанной трансформации ряда клеточных клонов [2, 14, 29]. Культуры клеток, выделенные нами из менструальной крови, прошли более 45 циклов удвоений от момента ввода их в культуру до старения. При этом кариотип исследуемых клеток на разных пассажах, в том числе и при длительном культивировании, сохранял свой нормальный количественный состав.

Другой основной характеристикой стволовых клеток является экспрессия специфических маркеров, как правило, поверхностных. Проточная цитофотометрия использовалась в качестве метода верификации стволовых клеток по их маркерам. Данный метод показал, что выделенные из менструальной крови стволовые клетки экспрессируют следующие поверхностные молекулы: CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105. При этом маркеры гемопоэтических стволовых клеток CD 34 и CD45, CD19, CD130 и HLA-DR (класса II) на поверхности исследуемых клеток обнаружены не были (табл. 1). Полученная характеристика стволовых клеток, выделенных из менструальной крови, соответствует критериям Международного общества клеточной терапии для фенотипирования мезенхимальных стволовых клеток человека по экспрессии поверхностных маркеров [17].

Обязательным свойством стволовых клеток является их мультипотентность, т. е. способность спонтанно или под действием определенных внешних стимулов дифференцироваться в несколько клеточных типов в пределах одного зародышевого листка. Полученные культуры стволовых клеток эндометриального происхождения дифференцировались в адипоциты и остеобласты. Эффективность адипогенной и остеогенной дифференцировки составила соответственно 70–80% и 30%.

Применение стволовых клеток в клинической практике предполагает их значительный клеточный объем. Но процессы старения и возможный феномен спонтанной трансформации ограничивают использование клеток, находящихся на поздних этапах культивирования. Таким образом, возникает необходимость сохранения стволовых клеток после первых пассажей и их идентификации. Кримоконсервация стволовых клеток на ранних пассажах позволяет накопить требующуюся биомассу без потери их свойств. Длительное культивирование эндометриальных стволовых клеток, прошедших процедуры кримоконсервации и последующего размораживания, показало их высокую жизнеспособность, пролиферативную активность и неизменную морфологию. Размороженные эндометриальные стволовые клетки также сохраняли характерную фенотипическую экспрессию поверхностных маркеров.

Обсуждение результатов

К стволовым клеткам, как фундаментальной основе клеточных технологий, предъявляют многочисленные требования. Получение соматических стволовых клеток должно быть безопасным для донора, технически не сложным и экономически доступным. Ткань взрослого человека, используемая в качестве источника стволовых клеток, должна содержать большое количество искомым стволовых клеток. Возобновляемость источника соматических стволовых клеток и, соответственно, возможность повторного донорства и аутодонорства могут быть дополнительными достоинствами. Менструальная кровь в рамках описанных требований является уникальным источником стволовых клеток.

Выделенные нами из менструальной крови стволовые клетки по своей характеристике близки к мезенхимальным стволовым клеткам взрослых. При этом легкодоступность и безопас-

Таблица 1

Экспрессия CD маркеров эндометриальными стволовыми клетками по данным проточной цитофотометрии

Определяемый CD маркер	Характеристика маркера	Количество клеток, экспрессирующих CD маркер, %
CD29	Маркер мезенхимальных стволовых клеток и стволовых клеток печени	99,9
CD9	Маркер мезенхимальных стволовых клеток	98,3
CD44	Маркер мезенхимальных стволовых клеток	99,9
CD73	Маркер мезенхимальных стволовых клеток	99,9
CD90	Маркер Т-лимфоцитов, мезенхимальных стволовых клеток и гемопоэтических стволовых клеток	92,1
CD105	Маркер мезенхимальных стволовых клеток	99,9
CD45	Панлейкоцитарный маркер	0,18
CD34	Маркер гемопоэтических стволовых клеток	0,36

ность получения являются не единственными их преимуществами.

Менструальная кровь содержит относительно большое количество стволовых клеток в объеме ткани. Так, доля колониеобразующих единиц среди мононуклеаров костного мозга составляет 0,0005%; 0,25% клеток клипоаспирата обладают клоногенным потенциалом; в пуповинной крови доля стволовых клеток составляет около 0,000059% [1]. В ткани же эндометрия до 0,22% эпителиальных клеток и до 1,25% стромальных клеток обладают стволовыми свойствами [9].

Эндометриальные стволовые клетки обладают высоким пролиферативным потенциалом. Стандартное число удвоений эндометриальных стволовых клеток в культуре составляет 25–30, в отдельных случаях — до 68 [11, 23]. Результаты нашего исследования подтверждают эти данные. Наиболее хорошо изученные мезенхимальные стволовые клетки пуповинной крови и костного мозга обладают меньшими пролиферативными возможностями [11, 22].

Самым строгим требованием, которое предъявляется к стволовым клеткам, претендующим на использование в клинической практике, является доказанное отсутствие феномена трансформации клеток. Отдельные описания случаев генетической нестабильности мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и жировой ткани [20, 30] являются основанием для осторожного использования продуктов на основе этих клеток в терапевтических целях. Изменения кариотипа эндометриальных стволовых клеток в процессе культивирования не описано [26]. В исследованиях на животных, посвященных безопасности использования стволовых клеток эндометриального происхождения, опухоленности активности выявлено не было [7, 13, 26].

В настоящее время стволовые клетки, выделенные из менструальной крови, активно используются лабораториями всего мира для изучения биологических свойств и терапевтических возможностей стволовых клеток [6, 12, 25]. Преимущества эндометриальных стволовых клеток перед соматическими стволовыми клетками другого происхождения способствуют их внедрению в клиническую практику [13, 31].

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства образования и науки Российской Федерации № 16.512.11.2190.

Литература

1. Волчков С. Е., Тюмина О. В., Волова Л. Т. Определение оптимального источника ММСК для создания банка клеток // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2010. — № 3. — С. 22.
2. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки деквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека / Земелько В. И. [и др.] // Цитология. — 2011. — № 12. — С. 919–928.
3. Никольский Н. Н., Габай И. А., Сомова Н. В. Эмбриональные стволовые клетки человека. Проблемы и перспективы // Цитология. — 2007. — Т. 49. — С. 529–537.
4. О возможности получения стволовых клеток из деквамированного эндометрия / Кирсанов А. А. [и др.] // Проблемы репродукции. — 2010. — № 3. — С. 28–29.
5. Понов Б. В. Введение в клеточную биологию стволовых клеток: учебно-методическое пособие. — СПб.: СпецЛит, 2010. — 319 с.
6. Allickson J., Xiang C. Human adult stem cells from menstrual blood and endometrial tissue // J. Zhejiang Univ. Sci. B. — 2012. — Vol. 13, N 5. — P. 419–420.
7. Allogeneic endometrial regenerative cells: An «Off the shelf solution» for critical limb ischemia / Murphy M. P. [et al.] // J. Translational Medicine. — 2008. — Vol. 6. — P. 45.
8. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation for patients with Rutherford grade II–III thromboangiitis obliterans / Durdu S. [et al.] // J. Vase. Surg. — 2006. — Vol. 44. — P. 732–739.
9. Chan R. W., Schwab K. E., Gargett C. E. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells // Biol. Reprod. — 2004. — Vol. 70. — P. 1738–1750.
10. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an Ataxia Telangiectasia patient / Amarglio N. [et al.] // PLoS Med. — 2009. URL:// <http://www.plosmedicine.org/article/info:doi/10.1371/journal.pmed.1000029> (дата обращения: 14. 05. 12).
11. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population / Meng X. [et al.] // J. Transl. Med. — 2007. — Vol. 5. — P. 57.
12. Endometrial stem cell transplantation restores dopamine production in a Parkinson's disease model / Wolff E. F. [et al.] // J. Cell. Mol. Med. — 2011. — Vol. 15. — P. 747–755.
13. Feasibility investigation of allogeneic endometrial regenerative cells research / Zhong Z. [et al.] // J. Translational Medicine. — 2009. — Vol. 7. — P. 15.
14. Gargett C. E., Masuda H. Adult stem cells in the endometrium // Molecular Human Reproduction — 2010. — Vol. 16, N 16. — P. 818–834.
15. Gargett C. E. Stem cells in gynaecology // Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol. — 2004. — Vol. 44, N 5. — P. 380–386.
16. Hentze H., Graichen R., Colman A. Cell therapy and the safety of embryonic stem cell-derived grafts / Trends Biotechnol. — 2007. — Vol. 25, N 1. — P. 24–32.
17. Husein K. S., Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status // Stem cells. — 2010. — Vol. 28. — P. 585–596.
18. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy / Terai S. [et al.] // Stem Cells. — 2006. — Vol. 24, N 10. — P. 2292–2298.
19. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration / Rama P. [et al.] // N. Engl. J. Med. — 2010. — Vol. 363. — P. 147–155.

20. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation / Røslund G. V. [et al.] // *Cancer Res.* — 2009. — Vol. 69. — P. 5331–5339.
21. Mesenchymal stem cells accelerate bone allograft incorporation in the presence of diabetes mellitus / Breitbart E. A. [et al.] // *J. Orthop. Res.* — 2010. — Vol. 28, N 7. — P. 942–949.
22. Multipotent menstrual blood stromal stem cells, isolation characterization and differentiation / Patel A. N. [et al.] // *Cell Transplant.* — 2008. — Vol. 17. — P. 303–311.
23. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells / Hida N. [et al.] // *Stem Cells.* — 2008. — Vol. 26. — P. 1695–1704.
24. Osteogenesis of human mesenchymal stem cells on micro-patterned surfaces / Kaivosoja E. [et al.] // *J. Biomater. Appl.* — 2011. — Vol. 15.
25. Production of functional dendritic cells from menstrual blood — a new dendritic cell source for immune therapy / Phuc P. V. [et al.] // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* — 2011. — Vol. 47, N 5–6. — P. 368–375.
26. Recent studies assessing the proliferative capability of a novel adult stem cell identified in menstrual blood / Allickson J. G. [et al.] // *Open Stem Cell J.* — 2011. — Vol. 3. — P. 4–10.
27. Repair of bone defect using bone marrow cells and demineralized bone matrix supplemented with polymeric materials / Kurkalli B. G. [et al.] // *Curr. Stem. Cell Res. Ther.* — 2010. — Vol. 5, N 1. — P. 49–56.
28. Skin engineering for burns treatment / Lataillade J. J. [et al.] // *Bull. Acad. Natl. Med.* — 2010. — Vol. 194, N 7. — P. 1339–1351.
29. Spontaneous expression of embryonic factors and p53 point mutations in aged mesenchymal stem cells: a model of age-related tumorigenesis in mice / Li H. [et al.] // *Cancer Res.* — 2007. — Vol. 67. — P. 10889–10898.
30. Spontaneous human adult stem cell transformation / Rubio D. [et al.] // *Cancer Res.* — 2005. — Vol. 65. — P. 3035–3039.
31. Toward personalized cell therapies: autologous menstrual blood cells for stroke / Rodrigues M. C. O. [et al.] // *J. Biomed. Biotechnol.* — 2011. — Vol. 2011. — ID 194720.
32. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial / Tateishi-Yuyama E. [et al.] // *Lancet.* — 2002. — Vol. 360. — P. 427–435.

Статья представлена И. Ю. Коганом,
СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова,
ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН,
Санкт-Петербург

THE METHOD OF STEM CELLS OBTAINING FROM MENSTRUAL BLOOD

Aylamazyan E. K., Niauri D. A., Gzgzzyan A. M.,
Dzhemlikhanova L. K., Usoltseva Y. O.

■ **Summary:** The article describes a technique of stem cells isolation from menstrual blood. The characteristics of the obtained stem cells line also present.

■ **Key words:** stem cells; endometrial stem cells; stem cells' cultivation; multipotential stem cells.

■ Адреса авторов для переписки

Айламазян Эдуард Карпович — з. д. н., директор, академик РАМН, профессор. ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН.

199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3.

E-mail: arutjunyan@aa3703.spb.edu.

Ниаури Дарико Александровна — д. м. н., профессор, заведующая кафедрой акушерства, гинекологии и репродуктологии Медицинский факультет. Санкт-Петербургский государственный университет.

199034, Россия, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9.

E-mail: d.niauri@mail.ru.

Гзгзян Александр Мкртичевич — д. м. н., руководитель отделения вспомогательных репродуктивных технологий. ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3. **E-mail:** aggzzyan@hotmail.com.

Джемликханова Ляйля Харьясовна — к. м. н., доцент кафедры акушерства, гинекологии и репродуктологии Санкт-Петербургского государственного университета. Медицинский факультет. 199034, Россия, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9.

E-mail: dzhemlikhanova_l@mail.ru.

Усолцева Елена Олеговна — ординатор кафедры акушерства, гинекологии и репродуктологии Санкт-Петербургского государственного университета. Медицинский факультет. 199034, Россия, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9. **E-mail:** usolceva.elena@inbox.ru.

Aylamazyan Eduard Karpovich — the chief, academician, professor. FSBI “The D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology” NWB RAMS. 199034 Russia, St. Petersburg, Mendeleyevskaya Line, 3.

E-mail: arutjunyan@aa3703.spb.edu.

Niauri Dariko Aleksandrovna — MD, PhD professor, the head of obstetrics, gynecology and reproductology department, Faculty of Medicine, St. Petersburg State University. Faculty of Medicine.

199034, Russia, St. Petersburg, Universitetskaya nab., 7/9.

E-mail: d.niauri@mail.ru.

Gzgzzyan Aleksandr Mkrlichevich — MD, PhD, the head of the assisted reproductive technology department. FSBI “The D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology” NWB RAMS. 199034 Russia, St. Petersburg, Mendeleyevskaya Line, 3. **E-mail:** aggzzyan@hotmail.com.

Dzhemlikhanova Lyailya Kharyasovna — MD, PhD, curriculum director, associate professor of the department of obstetrics, gynecology and reproductology. Faculty of Medicine. 199034, Russia, St. Petersburg, Universitetskaya nab., 7/9.

E-mail: dzhemlikhanova_l@mail.ru.

Usoltseva Yelena Olegovna — MD. St. Petersburg State University, Faculty of Medicine, Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductology. 199034, Russia, St. Petersburg, Universitetskaya nab., 7/9.

E-mail: usolceva.elena@inbox.ru.