Evaluation of bone marrow stromal cells regarding their role in hematopoietic reconstitution

Nikolai Y. Tsvetkov, Ildar M. Barkhatov, Alain I. Shakirova, Dmitri S. Romaniuk, Olesya G. Smykova, Vera V. Teplyashina, Ludmila S. Zubarovskaya, Boris V. Afanasyev
[1]R. M. Gorbacheva Memorial Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation, First Pavlov St. Petersburg State Medical University, [2]St. Petersburg State Polytechnical University, St. Petersburg, Russian Federation

Contact: Dr. Nikolai Yu. Tcvetkov
E-Mail: nikolai.tcvetkov@yandex.ru

Introduction

The role of stromal microenvironment in hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is based on their nonlineage-specific effects upon proliferation and differentiation of HSCs. Deficient graft functioning observed in some cases necessitates development of functional tests for the stromal cells, in order to prove clinical indications for co-transplanting of hematopoietic and stromal cells (SC), and, probably, introduction of alternative therapeutic approaches.

The aim of this study was to investigate the role of bone marrow stromal cells in the course of donor marrow cells engraftment and its significance for post-transplant complications.

Materials and methods

The study included clinical observations of post-transplant course in ten patients with acute myeloid leukemia (AML) and 7 healthy donors. Bone marrow nucleated cells were selectively harvested two weeks prior to BMT, followed by monolayer culture in alpha-MEM culture medium with 20% fetal bovine serum. Upon growth of fibroblast-like cell colonies (CFU-F), their hematopoiesis-supporting activity was determined in agar-drop/liquid culture system, along with their differentiating ability towards adipogenic and osteogenic pathways. We have also measured the relative expression of selectin and CXCR4 genes in these populations.

Results

When comparing functional characteristics of SC from healthy donors and AML patients, an increased hemostimulating activity of the later was noted, as reflected by an increase in large and small CFU-GM numbers ($p<0,02$). In addition, an increase in convential differentiation ability was observed in AML patients ($p=0,03$). Moreover, the number of CFU-Fs, capable for adipogenic differentiation showed inverse correlation with platelet recovery terms ($p=0,05$). By the contrast, higher numbers of osteogenic colonies in culture was associated with increased terms of leukocyte lineage engraftment ($p=0,05$). Furthermore, a direct correlation was observed between CFU-F capable of osteogenic differentiation, and the number of blast cells at the time of transplantation ($p=0,05$). When analyzing gene expression in SC population, we have that a decreased expression of CXCR4 gene responsible for the homing effect proved to be dependent on the patient's age ($p=0,05$). It was also revealed that higher selectin gene expression in SC population of AML patients was significantly higher than in the cells from healthy donors.

Conclusion. Stromal cells derived from the patients' bone marrow exhibit higher proliferative activity and marked expression of molecules mediating HSC homing, as compared with a group of healthy donors. That finding could be explained by affection of stromal cells by previous chemotherapy and myelosuppression. BMSC from AML patients taken before bone marrow transplantation are characterized by a more pronounced capacity to osteogenic and adipogenic differentiation than those from healthy donors. Increased adipogenic differentiation ability of the SCs is associated with a more rapid recovery of hematopoiesis.

Keywords

Acute myeloid leukemia, mesenchymal stem cells, hemostimulating activity, engraftment, bone marrow transplantation.

Оценка свойств стромальных клеток костного мозга в аспекте их роли в восстановлении гемопоэза

Николай Ю. Цветков, Ильдар М. Бархатов, Алена И. Шакирова, Дмитрий С. Романюк, Олеся Г. Смыкова, Вера В. Тепляшина, Алексей Б. Чухловин, Людмила С. Зубаровская, Борис В. Афанасьев
НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачевой, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И. П. Павлова, Санкт- Петербург, Россия

Введение

Роль стромального микроокружения в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) заключается в не линие-специфическом воздействии на пролиферацию и дифференцировку ГСК. Наблюдаемая в ряде случаев гипофункция трансплантата обуславливает необходимость разработки функциональных тестов исследования клеток стромы с целью обоснования показаний к совместной трансплантации гемопоэтических и стромальных клеток (СК) и, возможно, внедрения иных терапевтических подходов. Целью данного исследования является изучение роли стромальных клеток костного мозга в процессе приживления донорского костного мозга и их значения в развитии посттрансплантационных осложнений.

Материалы и методы

В исследовании проводился анализ течения посттрансплантационного периода у 10 пациентов с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) и 7 здоровых доноров. За 2 недели до проведения ТКМ после проведении миелоэксфузии проводилась селекция ядросодержащих клеток с последующей эксплантацией на культуральную поверхность с культуральной средой aMEM, содержащей 20% сыворотки. При формировании колоний фибробласт-подобных клеток (КОЕ-Ф) проводился анализ их гемостимулирующей активности (в культуральной системе «агаровая капля-жидкая среда»), способности к дифференцировке (адипогенной и остеогенной), проводился анализ относительной экспрессии генов SELECTIN и CXCR4. Результаты. При сравнении функциональных характеристик СК здоровых доноров и пациентов было отмечено у последних увеличение гемостимулирующей активности, выражающейся в увеличении больших и малых КОЕ-ГМ ($p<0,02$). Помимо этого, было отмечено увеличение способности к ортодоксальной дифференцировке у пациентов с ОМЛ ($p=0.03$), причем количество КОЕ-Ф, способных к адипогенной дифференцировке находилось в обратной корреляционной зависимости к срокам восстановления тромбоцитов ($p=0,05$). Напротив, на фоне увеличения колоний, способных к остеогенной дифференцировке отмечается увеличение сроков приживления клеток лейкоцитарного пулла ($p=0,05$). Помимо этого, было отмечена прямая корреляционная зависимость между КОЕ-Ф, способных к остеогенной дифференцировке и количеством бластных клеток на момент трансплантации ($p=0,05$). При анализе экспрессии ряда генов в популяции стромальных клеток, ассоциированных с их функциональными характеристиками было выявлено снижение экспрессии гена CXCR4, обуславливающего хоуминг-эффект, в зависимости от возраста пациента ($p=0,05$). Также было выявлено, что в группе пациентов в популяции СК отмечается существенно более высокая экспрессия гена SELECTIN по сравнению с группой здоровых доноров.

Заключение

СККМ пациентов перед ТКМ в сравнении с группой здоровых доноров характеризуются более высокой пролиферативной активностью и экспрессией молекул, опосредующих хоуминг ГСК, что можно объяснить реакцией стромы на предшествующие курсы химиотерапии и миелосупрессию. СККМ пациентов перед ТКМ в сравнении с группой здоровых доноров характеризуются более выраженной способностью к остеогенной и адипогенной дифференцировке. При этом увеличение активности адипогенной дифференцировки ассоциировано с укорочением сроков восстановления кроветворения, а остеогенной – с большим процентом бластов в костном мозге, что может препятствовать приживлению трансплантата и продлевать процесс реконституции гемопоэза.

Ключевые слова

Острый миелоидный лейкоз, мезенхимные стволовые клетки, гемостимулирующая активность, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, приживление.