

УДК 616-008.853.3

МЕТОДИКА ВЫДЕЛЕНИЯ ИЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ МОБИЛИЗИРОВАННЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОЦЕДУРЫ ЦИТАФЕРЕЗА

Смагин А.А., Кочеткова М.В., Хабаров Д.В., Повещенко О.В.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии»
Сибирского отделения РАМН, Новосибирск, e-mail: masha0112@mail.ru

Проведена оценка безопасности и эффективности выделения из периферической крови мобилизованных клеток костного мозга с использованием процедуры цитафереза на сепараторе клеток Haemonetics, MCS+. Проводилась оценка гемопоэтических и эндотелиальных прогениторных стволовых клеток полученных на сепараторе клеток крови, оценка структурной целостности клеток. Учитывая количество клеток с фенотипом гемопоэтических и эндотелиальных прогениторных клеток, мононуклеарные клетки мобилизованные и полученные предложенным нами способом, могут служить источником стволовых клеток для стимуляции ангиогенеза и лимфангиогенеза.

Ключевые слова: мононуклеарная клетка, цитаферез

METHOD OF ISOLATION MOBILIZED BONE MARROW CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD BY THE PROCEDURE CYTAPHERESIS

Smagin A.A., Kochetkova M.V., Khabarov D.V., Poveshenko O.V.

FGBU «Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology», Novosibirsk,
e-mail: masha0112@mail.ru

Mobilized from bone marrow cells have been isolated from peripheral blood by a procedure cytapheresis (separator Haemonetics, MCS +). An assessment of safety and efficacy procedure of isolation of these cells has been carried out. An assessment of hematopoietic and endothelial progenitor stem cells obtained by a separator has been carried out. An assessment of these cells revealed intact of their structure. The cells with the hematopoietic and endothelial progenitor phenotype have been isolated by a procedure cytapheresis in enough quantity. The mononuclear cells mobilized and obtained suggested method could use as a source of stem cells for the stimulation of angiogenesis and lymphangiogenesis.

Keywords: mononuclear cell, cytapheresis

Сегодня в мире активно обсуждаются вопросы клеточной медицины и биотехнологии. Современная медицина рассматривает методики лечения с использованием плюрипотентных аутоклеток пациента при различных патологиях как одни из самых перспективных [5, 7]. Наряду с гемопоэтическими клетками, перспективно использование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга были обнаружены среди адгезивной фракции клеток стромы костного мозга [2, 5]. В экспериментах *in vitro* была показана высокая пролиферативная активность этих клеток, а также их способность дифференцироваться в жировую, костную, хрящевую, нейрональную и мышечную ткань [1, 3]. В отдельных экспериментах удавалось дифференцировать эти клетки в кардиомиоциты, гепатоциты, инсулин-продуцирующие клетки [2, 8].

В настоящее время в клинических испытаниях преимущественно используются аутологичные мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки аспирата костного мозга. Процедура получения материала достаточно болезненна и травматична и может вызвать ряд нежелательных

реакций [4, 6]. В изученной литературе мы не нашли однозначного ответа на вопрос, какую методику получения прогениторных клеток безопаснее и лучше использовать. В то же время ясно, что это должен быть аутологичный материал, методы получения клеток максимально безопасными и насколько это возможно, минимально инвазивными.

Цель исследования. Оценить безопасность и эффективность выделения из периферической крови мобилизованных клеток костного мозга с использованием процедуры цитафереза на сепараторе клеток Haemonetics, MCS+.

Материалы и методы исследования

В исследование входило 33 пациента с различной терапевтической патологией, в рамках протоколов одобренных локальным этическим комитетом НИИ-КЭЛ СО РАМН, протоколы №35 от 29.08.2007 «Хирургические и клеточные методики лечения больных с облитерирующим атеросклерозом», протокол № 7 от 10.10.2007 «Изучение эффективности лечения больных с постмастэктомической лимфедемой с применением мобилизованных под действием нейпогена малых лимфоцитов». Введение пациентам препарата Нейпоген(G-CSF) п/к в течение 5 дней в дозе 10мкг/кг веса для увеличения пула прогениторных клеток в периферической крови путем их мобили-

зации из костного мозга. Проводится ежедневный скрининг количества лейкоцитов, тромбоцитов, свертываемости периферической крови ежедневно. На 6 сутки с целью сбора периферических прогениторных клеток использовали аппаратный цитаферез на сепараторе клеток крови «Haemonetics», MCS+, протокол PBSC, сет REF 971 E (Haemonetics Corporation, США).

Методика проведения процедуры аппаратного цитафереза. После катетеризации периферической вены пациенту внутривенно капельно переливали 250 мл раствора кристаллоидов (0,9 процентный раствор NaCl + гепарин 100 ед/кг). Скорость перфузии составляла от 30 мл/мин до 50 мл/мин, объем перфузируемой крови за процедуру зависел от концентрации получаемых лимфоцитов и составлял от 30 до 40 % объема циркулирующей крови. Скорость центрифуги, количество используемого антикоагулянта определялись автоматически, в рамках протокола PBSC. Во время процедуры цитафереза осуществлялся мониторинг артериального давления, пульса, сатурации («Nihon Kohden», Japan). Полученная взвесь клеток в дальнейшем отстаивалась при температуре 37 °C в фляконе в течение 1-1,5 ч. Сбор прогениторных клеток из флякона и осаждение клеток 8-10 мин в центрифуге при 1,5 тыс об/мин. Работа проводится в стерильных условиях с использованием ламинарных боксов (II класс микробиологической безопасности) с использованием стерильной (гамма-облучение) одноразовой посуды. Отмывка и сбор клеточной суспензии. Выделение фракции прогениторных клеток осуществлялось на градиенте плотности фиколла-верографина. Оценивалась структурная целостность клеток. С этой целью выделенную из крови взвесь клеток фиксировали в 2,5 % растворе глутаральдегида на фосфатном буфере, затем в 1 % растворе OsO₄ на фосфатном буфере, дегидратиро-

вали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон. Из полученных блоков готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм, окрашивали толудиновым голубым, изучали под световым микроскопом и выбирали необходимые участки для исследования в электронном микроскопе. Из отобранного материала получали ультратонкие срезы толщиной 35-45 нм на ультратоме LKB-8800, контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата, цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM 1010. Лимфоциты фотографировали при увеличении 6000 в электронном микроскопе. Морфометрические исследования лимфоцитов выполняли в соответствии с общепринятыми принципами и методами при увеличении в 48000 и использовании открытой тестовой системы. Статистическую обработку количественных показателей проводили с помощью критерия Стьюдента, достоверность различия считали при $P \leq 0,05$. В полученной взвеси клеток $63 \pm 17 \cdot 10^6$ /мл, $p < 0,05$, определяли содержание цитокинов мононуклеарных клеток. Содержание в супернатантах цитокинов оценивали методом ИФА (Вектор-Бест).

Результаты исследования и их обсуждение

Процедуры, связанные с протоколом исследования, переносились хорошо, не зарегистрировано осложнений, как во время мобилизации клеток из костного мозга, так и во время процедуры цитафереза. Переносимость процедуры пациентами оценивалась, как удовлетворительная. Исследование показало, что мононуклеары, полученные на сепараторе клеток крови Haemonetics MCS+, сохраняли структурную целостность (рис. 1).

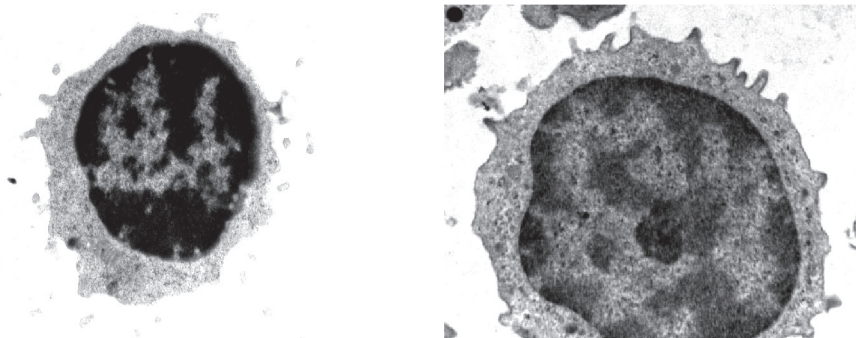


Рис. 1. Ультраструктура выделенных из крови мононуклеаров

В цитоплазме клеток отмечали немногочисленные цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума, комплекса Гольджи, прикрепленные и свободные полисомальные рибосомы, лизосомы. Немногочисленные ми-

тохондрии имели хорошо выраженные кристы. Ядро имело обычное для мононуклеаров распределение гетерохроматина. Плазматическая мембрана клеток образовывала выросты и микроворсинки (рис. 2).

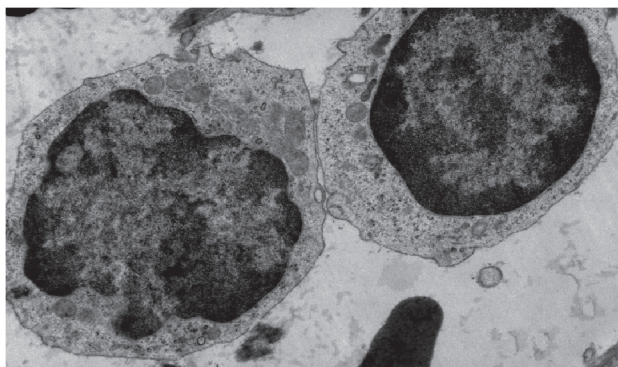


Рис. 2. Ультраструктура выделенных из крови лимфоцитов. Увеличение 12000

Количество гемопоэтических и эндотелиальных прогениторных стволовых клеток полученных на сепараторе клеток крови составило:

- CD 34+: $45,0 \pm 3,1 \cdot 10,6/\text{мл}$.
- CD34+/133+: $1,0 \pm 0,10 \cdot 10,6/\text{мл}$.
- CD34+/VEGFR2: $2,0 \pm 0,14 \cdot 10,6/\text{мл}$.

Заключение

Таким образом, методика выделения мононуклеаров на сепараторе клеток крови Naemonetics, MCS+ не приводит к нарушению структуры клеток, не вызывает повреждения мононуклеарных клеток. Является малоинвазивной и безопасной методикой для пациента, что немаловажно в клиническом аспекте. Учитывая количество клеток с фенотипом гемопоэтических и эндотелиальных прогениторных клеток, мононуклеарные клетки мобилизованные и полученные предложенным нами способом, могут служить источником стволовых клеток для стимуляции ангиогенеза и лимфангиогенеза.

Список литературы

1. Baksh D., Song L., Tuan R.S. 2004. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J. Cell Mol. Med.* 8: 301–316.
2. Barry F.P., Murphy J.M. 2004. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36: 568–584.
3. Caplan A.I. 1991. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 9: 641–650.
4. Henon P.R. 2003. Human embryonic or adult stem cells: an overview on ethics and perspectives for tissue engineering. *Adv. Exp. Med. Biol.* 534: 27–45.
5. Jackson L., Jones D.R., Scotting P., Sottile V. 2011. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J. Postgrad. Med.* 53: 121–127.
6. Kues W.A., Petersen B., Mysegades W., Carnwath J.W., Niemann H. 2009. Isolation of murine and porcine fetal stem cells from somatic tissue. *Biol. Reprod.* 72: 1020–1028.
7. Peault B., Rudnicki M., Torrente Y., Cossu G., Tremblay J.P., Partridge T., Gussoni E., Kunkel L.M., Huard J. 2007. Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol. Ther.* 15: 867–877.
8. Usas A., Huard J. 2007. Muscle-derived stem cells for tissue engineering and regenerative therapy. *Biomaterials.* 28: 5401–5406.