

нений). Рецидив заболевания наблюдался у 2 (8 %) больных, не отмечалось приживления трансплантата у 2 (8 %) пациентов. Общая выживаемость после трансплантаций ПК составила 72 % (18 пациентов), общая безрецидивная выживаемость 56 % (14 пациентов) (медиана наблюдения 150 дней).

Выводы

Таким образом, данные результаты показывают, что трансплантация гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови — эффективный метод лечения онкогематологических заболеваний, является безопасным для донора (отсутствует риск для здоровья матери и ребенка), обеспечивается быстрый подбор трансплантата (так как все ЕПК, находящиеся на криогенном хранении, прошли HLA-типирование; возможна трансплантация при неполной HLA-совместимости). Целесообразно расширение регистра банков пуповинной крови для повышения вероятности подбора подходящей ЕПК для реципиента.



Гребнев Дмитрий Юрьевич

Ведущий научный сотрудник
ГБУЗСО «Институт медицинских клеточных технологий»,
ассистент кафедры патологической физиологии ГБОУ ВПО
«Уральский государственный медицинский университет»
Минздрава РФ, Екатеринбург

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ ГСК ПРИ ПРОВЕДЕНИИ СОЧЕТАННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ С ММСК НА РЕГЕНЕРАЦИЮ МИЕЛОИДНОЙ ТКАНИ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Гребнев Д. Ю., Маклакова И. Ю., Ястребов А. П.

ГБУЗСО Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург
ГБОУ ВПО УГМУ Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург

В настоящее время нет единой точки зрения об эффективной терапевтической дозе гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). По данным Э. Глюкман для успешного приживления трансплантата необходимо вводить реципиенту не менее $300 \cdot 10^5$ ядросодержащих клеток пуповинной крови или $1 \cdot 10^5$ CD 34⁺ кл./кг [6]. Опыт работы Института стволовых клеток человека, г. Москва говорит о том, что критическая доза клеток, меньше которой смертность значительно

возрастает, составляет $1,7 \cdot 10^5$ CD 34+ кл./кг [2]. Исследования, проведенные V. Rocha, свидетельствуют, что критически значимым для клинического использования будет содержание ядросодержащих клеток пуповинной крови менее $2,5 \cdot 10^7$ кл./кг, а количество CD34+ клеток менее $2 \cdot 10^5$ кл./кг [3]. Исследования, проведенные в Институте молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина (Казахстан), позволили установить, что трансплантация 1×10^6 кл./кг культивированных ГСК лабораторным крысам стимулирует процессы репаративно-го моделирования миокарда и ангиогенез после индуцированного инфаркта миокарда [1]. Целью данного исследования стало изучение влияния различных доз ГСК при проведении сочетанной трансплантации с мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками (ММСК) на регенерацию миелоидной ткани после воздействия ионизирующего излучения.

Эксперименты выполнены на 36 белых лабораторных мышах-самцах возраста 3–4 месяцев, массой 25–30 г. Эксперименты по получению культуры ММСК и ГСК выполнены из плаценты (хорион) 10 лабораторных животных мышей-самок возраста 3–4 месяца, массой 30 г, срок гестации 14 дней. Изучалось воздействие ионизирующего излучения дозой 4,0 Гр. Животным опытной группы внутривенно вводилась суспензия ММСК и ГСК. Было изучено влияние ГСК в дозах 250 тыс. клеток/кг, 300 тыс. клеток/кг, 330 тыс. клеток/кг при проведении сочетанной трансплантации с ММСК в дозе 6 млн.кл./кг. Клетки перед сочетанной трансплантацией были суспендированы в 0,2 мл 0,9 % раствора NaCl. Контрольной подгруппе вводили 0,9 % раствор NaCl — 0,2 мл внутривенно. Внутривенные введения осуществлялись через 1 час после облучения однократно. Забой животных осуществлялся на 1 и 7 сутки после облучения.

Культивирование ММСК проводилось в условиях CO_2 — инкубатора при температуре 37 °С с содержанием углекислого газа 5 % и влажностью 90 %. Для трансплантации лабораторным животным были использованы клетки третьего пассажа. Идентификация ММСК была проведена по способности полученной культуры клеток дифференцироваться в адипоцитарном и остеогенном направлениях [4]. Также принадлежность полученных клеток к ММСК была доказана иммуноцитохимическим методом с использованием набора Mesenchymal Stem Cell Characterization Kit (Millipore) [5]. При этом были использованы позитивные (интегрин $\beta 1$, CD54, фибронектин, коллаген I типа) и негативные маркеры (CD14 и CD45). Выделение ГСК осуществлялось методом прямой иммуномагнитной сепарации по антигенам SCA-1 (StemCell Technologies, Канада) и CD117 (StemCell Technologies, Канада). Проведенные исследования позволили установить, что содержание клеток после иммуномагнитной сепарации с иммунофенотипом CD117+, Sca-1+, Lin- составило 70–93 %. Жизнеспособность клеток, определенная с использованием трипанового синего составила 95–97 %.

Определяли общее количество миелокариоцитов в костном мозге бедренной кости. Мазки костного мозга окрашивали по Паппенгейму. Подсчет миелограммы производили на 500 клеток. Оценка пролиферативной активности элементов гранулоцитарного и эритроидного ростков производилась в цитологических мазках костного мозга с помощью митотического индекса соответствующих дифферонов.

$$\text{МИ} = \frac{\text{Количество митотически делящихся элементов изучаемого роста}}{1000 \text{ подсчитанных клеток костного мозга}} * 1000 \text{ ‰}$$

С целью определения содержания цитогенетически измененных клеток производился микроядерный тест.

$$\text{МЯТ} = \frac{\text{Число полихроматофильных эритроцитов с микроядрами}}{1000 \text{ полихроматофильных эритроцитов}} * 1000 \text{ ‰}$$

При определении числа ретикулоцитов их подсчитывали в окрашенных бриллиант – крезил – блау мазках крови (на 2000 эритроцитов) с последующим переводом результата в единицы СИ – гига на литр (Г/л). Мазки периферической крови окрашивали по Романовскому. Подсчет лейкоцитарной формулы проводили на 200 клеток.

Цитологические препараты костного мозга и периферической крови анализировались с помощью микроскопа Micros MC-50 (Австрия) при увеличении 100*15.

Для каждого ряда значений показателя вычисляли среднюю арифметическую, стандартную ошибку среднего. Достоверность отличий в сравниваемых выборках проведено по критерию Манна – Уитни (U). В некоторых случаях для вычисления статистической значимости полученных результатов использовался критерий хи-квадрат (χ^2). Статистическая обработка данных проведена с помощью программного пакета SPSS Statistics (версия 17.0). Вероятность различий считалась достоверной при значениях $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На 7 сутки после воздействия ИИ на фоне сочетанной трансплантации ММСК в дозе 6 млн кл./кг и ГСК в дозе 250 тыс. кл./кг в костном мозге данные не отличались от показателей контрольной группы. В то же время при введении ММСК в дозе 6 млн кл./кг и ГСК в дозе 300 тыс. кл./кг отмечено увеличение количества митозов в эритроидном и гранулоцитарном ростках. Однако это не привело к увеличению количества отдельных фракций клеток эритроидного ростка, а также к существенному изменению общего количества эритроидных клеток и гранулоцитарных клеток (таблица 1).

На фоне трансплантации ММСК в дозе 6 млн. кл./кг и ГСК в дозе 330 тыс. кл./кг на 7 сутки после воздействия ИИ выявлено увеличение содержания миелобластов, миелоцитов, а также палочкоядерных и сегментоядерных форм лейкоцитов соответственно на 75,3 %, 51,1 % и 21,7 % относительно контрольной группы. Указанные изменения привели к активации гранулоцитопоза и увеличению общего содержания гранулоцитов на 23,6 % (Гр. эл.: 5,38 ± 0,19 млн клеток/бедро, $p < 0,05$). В эритроидном диффероне выявлено увеличение содержания полихроматофильных нормобластов (1,34 ± 0,06 млн клеток/бедро, $p < 0,05$). При этом отмечено увеличение общего содержания эритроидных элементов на 22,1 % (таблица 1).

При изучении данных периферической крови на 7 сутки после воздействия ИИ на фоне сочетанной трансплантации ММСК в дозе 6 млн. кл./кг и ГСК в дозах 250 тыс. кл./кг и 300 тыс. кл./кг выявлено низкое содержание ретикулоци-

Таблица 1

Содержание клеток костного мозга в бедренной кости зрелых лабораторных мышей на 7 сутки после воздействия ИИ на фоне сочетанной трансплантации стволовых клеток, $M \pm m$, $p = 9$

Наименование клеточных элементов	Содержание клеток (млн. клеток/бедро).			
	NaCl	ММСК (6 млн кл./кг) и ГСК (250 тыс. кл./кг)	ММСК (6 млн кл./кг) и ГСК (300 тыс. кл./кг)	ММСК (6 млн кл./кг) и ГСК (330 тыс. кл./кг)
Миелокариоциты (общее число)	$7,98 \pm 1,35$	$8,00 \pm 0,76$	$8,61 \pm 0,33$	$10,07 \pm 0,83^*$
Нейтрофильные клетки	миелобласты	$0,15 \pm 0,03$	$0,14 \pm 0,03$	$0,16 \pm 0,03$
	промиелоциты	$0,11 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,02$
	миелоциты	$0,15 \pm 0,03$	$0,14 \pm 0,03$	$0,15 \pm 0,03$
	метамиелоциты	$0,42 \pm 0,02$	$0,43 \pm 0,02$	$0,44 \pm 0,02$
	палочкоядерные и сегментоядерные	$3,40 \pm 0,06$	$3,55 \pm 0,07$	$3,73 \pm 0,05$
Эозинофилы (всех генераций)	$0,14 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,02$
Все гранулоцитарные элементы	$4,35 \pm 0,40$	$4,48 \pm 0,52$	$4,69 \pm 0,39$	$5,38 \pm 0,19^*$
Эритробласты	$0,022 \pm 0,004$	$0,025 \pm 0,002$	$0,022 \pm 0,004$	$0,02 \pm 0,01$
Нормо-бласты	базофильные	$0,30 \pm 0,07$	$0,31 \pm 0,07$	$0,30 \pm 0,06$
	полихроматофильные	$1,15 \pm 0,04$	$0,98 \pm 0,30$	$1,02 \pm 0,30$
	оксифильные	0	0	0
Все эритроидные элементы	$1,48 \pm 0,08$	$1,31 \pm 0,27$	$1,31 \pm 0,30$	$1,80 \pm 0,08^*$
Лимфоциты	$1,67 \pm 0,33$	$1,97 \pm 0,40^*$	$2,35 \pm 0,38^*$	$1,93 \pm 0,14$
Прочие	$0,21 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,03^*$	$0,27 \pm 0,04^*$	$0,24 \pm 0,04$
Индекс созревания нейтрофилов	$0,25 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,04$	$0,23 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,01$
Индекс созревания эритрономобластов	$0,78 \pm 0,03$	$0,68 \pm 0,17$	$0,69 \pm 0,17$	$0,77 \pm 0,02$

Примечание: * отличие от контрольной подгруппы зрелых животных (после воздействия ИИ), достоверно с $p < 0,05$.

тов и лейкоцитов по сравнению с контролем. При этом обнаруженные изменения соответствовали данным, полученным при анализе клеточного состава костного мозга (таблица 2).

В то же время при трансплантации ММСК в дозе 6 млн кл./кг и ГСК в дозе 330 тыс. кл./кг отмечено увеличение содержания ретикулоцитов ($123,17 \pm 9,50$ Г/л, $p < 0,05$) на 24,6 %, лейкоцитов ($9,72 \pm 0,49$ Г/л, $p < 0,05$) на 30,1 % относительно контрольной подгруппы (таблица 2).

При анализе содержания цитогенетически измененных клеток в костном мозге установлено отсутствие значимого эффекта от проведенной трансплантации ММСК и ГСК в дозах 250 и 300 тыс. кл./кг. При этом показатель МЯТ значительно превышал значения нормы (таблица 3). Тогда как при трансплантации ММСК в дозе 6 млн кл./кг и ГСК в дозе 330 тыс. кл./кг при подсчете числа митозов в эритроидном и гранулоцитарном дифферонах обнаружено увеличе-

Таблица 2

Показатели периферической крови зрелых лабораторных мышей на 7 сутки после воздействия ИИ на фоне сочетанной трансплантации стволовых клеток, $M \pm m$, $n = 9$

	Ретикулоциты (Г/л)	Лейкоциты (общее содержание)	Гранулоциты (Г/л)	Лимфоциты (Г/л)	Моноциты (Г/л)
NaCl	98,83 ± 9,50	7,47 ± 1,20	1,82 ± 0,38	5,80 ± 0,67	0,37 ± 0,05
ММСК (6 млн кл./кг) и ГСК (250 тыс. кл./кг)	96,17 ± 6,83	7,89 ± 0,55	1,87 ± 0,33	5,67 ± 0,76	0,36 ± 0,07
ММСК (6 млн кл./кг) и ГСК (300 тыс. кл./кг)	110,00 ± 16,67	7,72 ± 0,69	1,87 ± 0,33	5,53 ± 0,84	0,32 ± 0,04
ММСК (6 млн кл./кг) и ГСК (330 тыс. кл./кг)	123,17 ± 9,50*	9,72 ± 0,49*	2,52 ± 0,29*	7,17 ± 0,34*	0,43 ± 0,05

Примечание: *отличие от контрольной подгруппы зрелых животных (после воздействия ИИ), достоверно с $p < 0,05$.

Таблица 3

Показатели регенераторной активности и содержание цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани лабораторных мышей на 7 сутки после воздействия ИИ на фоне сочетанной трансплантации стволовых клеток, $M \pm m$, $n = 9$

Параметры	Значения, %			
	NaCl	ММСК (6 млн кл./кг) и ГСК (250 тыс. кл./к)	ММСК (6 млн кл./кг) и ГСК (250 тыс. кл./к)	ММСК (6 млн кл./кг) и ГСК (250 тыс. кл./к)
Митотический индекс эритроидного дифферона	3,98 ± 0,48	4,30 ± 0,75	5,99 ± 1,37*	5,46 ± 0,92*
Митотический индекс гранулоцитарного дифферона	2,81 ± 0,39	3,15 ± 0,59	3,91 ± 0,61*	3,65 ± 0,37*
Содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами	7,87 ± 0,95*	7,20 ± 1,17*	7,04 ± 1,08*	2,91 ± 0,38**

Примечание: *отличие от контрольной подгруппы зрелых животных (после воздействия ИИ), достоверно с $p < 0,05$.

ние данных показателей на 37,42 и 29,78 % соответственно, отмечено снижение содержания цитогенетически измененных клеток. При этом содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами не только снизилось относительно контрольной подгруппы, но и соответствовало значениям СУМ (таблица 3).

Таким образом, проведенные исследования позволили обнаружить не только дозозависимый эффект трансплантированных ГСК, но и выявить минимальную эффективную дозу, которая бы позволила при совместном введении с ММСК активировать регенерацию тканей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беляев Н. Н. Влияние ИЛ-3 на регенеративную индукционную активность гемопоэтических стволовых клеток костного мозга при экспериментальном

инфаркте миокарда / Н. Н. Беляев, М. Р. Рысулы, А. С. Исабекова // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – Т. 4, № 4. – С. 50–55.

2. Исаев А. А. Применение клеток пуповинной крови в клинической практике / А. А. Исаев, В. С. Мелихова // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2008. – Т.3, № 1. – С. 34- 41.

3. Уфимцева А. И. Характеристика и ex vivo экспансия гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток пуповинной крови // А. И. Уфимцева, Е. В. Канов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т.7, № 4. – С. 21- 27.

4. Aparicio-Vergara, M. Bone marrow transplantation in mice as a tool for studying the role of hematopoietic cells in metabolic and cardiovascular diseases / M. Aparicio-Vergara, R. Shiri-Sverdlov, G.de Haan // Atherosclerosis. – 2010. – Vol. 213. – P.335–44.

5. Caplice, N. M. The future of cell therapy for acute myocardial infarction / N. M. Caplice // Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine. – 2006. – Vol. 3. – P.129–132.

6. Gluckman E., Rocha V. Cord blood transplantation: state of the art. Haematologica 2009; 94 (4); 451-4.



Волова Лариса Теодоровна

ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, директор Самарского банка тканей СамГМУ. г. Самара,
д.м.н., профессор

ВОЗМОЖНОСТИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ДЕФЕКТОВ СУСТАВНОГО ГИАЛИНОВОГО ХРЯЩА С ПОЗИЦИЙ КЛЕТОЧНО-ТКАНЕВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

*Волова Л. Т., Россинская В. В., Долгушкин Д. А.,
Болтовская В. В., Нефедова И. Ф., Тертерян М. А.*

ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России, Самара, e-mail :csrl.sam@mail.ru

При глубоком полнослойном повреждении суставной поверхности костно-хрящевые дефекты восполняются не в полном объёме и замещаются фиброзной тканью или волокнистым хрящом. Это приводит к прогрессированию де-