

immunohistochemical analyses that mononuclear cells adhered on the surface of the synthetic 3D-scaffold and proliferated (Ki-67 marker). Thus, it was shown that the tissue-engineered trachea is biocompatible with human autologous mononuclear cells.

**Keywords:** tissue-engineered trachea, synthetic scaffold, mononuclear cells, biocompatibility

#### REFERENCES

1. Marahaini M., Thirumulu P. M., Ismail Ab R. Genotoxicity evaluation of dental restoration nanocomposite using comet assay and chromosome aberration test. *Nanotechnology*. – 2013. – Vol.24(1). – p. 015105 (13pp).

2. Baiguera S., Macchiarini P., Domenico R. Chorioallantoic membrane for in vivo investigation of tissue engineered construct biocompatibility. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. – 2012. – Vol.100(5). – p.1425-1434.

3. Volova T. G. Shishackaja E. I., Mironov P. V. *Materialy dlja mediciny, kletochnoj i tkanevoj inzhenerii*. [Jelektronnyj resurs]: jelektron. ucheb. posobie– Jelektron. dan. (6 Mb). – Krasnojarsk : IPK SFU, 2009.

4. Jungebluth P., Johannes C. Haag J.C., Lim M.L., Lemon G., Sjöqvist S., Gustafsson Y., Ajallouecian F., Gilevich I., Simonson O.E., Grinnemo K.H., Corbascio M., Baiguera S., Gaudio C., Strömblad S., Macchiarini P. Verification of cell viability in bioengineered tissues and organs before clinical transplantation. *Biomaterials*. –2013. – Vol.34(16). – p. 4057 – 4067.

#### Authors

Gilevich Irina V.

Research Institute - Regional Clinical Hospital №1, Krasnodar, Russia st. 1 Maya 167, Krasnodar, 350086, Russian Federation

MD

giviliv@list.ru

Porhanov Vladimir A.

Research Institute - Regional Clinical Hospital №1, Krasnodar, Russia st. 1 Maya 167, Krasnodar, 350086, Russian Federation

MD, PhD, professor, the head of SCI-RCH#1

kkb1@mail.ru

УДК: 616-155

## *Иволгин Д.А., Енукашвили Н.И., Айзеништадт А.А., Адылов Ш.Ф.* **МОДИФИКАЦИЯ УСЛОВИЙ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

ГБОУ ВПО «Северо-Западный Государственный Медицинский Университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России,

НИЛ Клеточных технологий, Санкт-Петербург, Российская Федерация;

ООО Покровский Банк Стволовых клеток, Санкт-Петербург, Российская Федерация

**Резюме.** Культивирование стволовых клеток пуповинной крови (ПК) является одним из перспективных направлений по улучшению приживления, а, следовательно, повышению эффективности терапии. Для успешного культивирования необходим подбор ряда условий, что являлось целью данной работы. Было изучено влияние коэффициента разведения ПК буфером PBS (HyClone), содержащим 0,02% ЭДТА, а также влияние используемого при разведении буфера (раствор Хэнкса, HyClone+0,02%ЭДТА или PBS+0,02% ЭДТА) на чистоту выделения и жизнеспособность клеток, выделенных из 18 образцов ПК и культивированных. При подборе коэффициента разведения препаратов ПК установлено, что оптимальным для буфера PBS+0.02% ЭДТА перед центрифугированием на фиколле является разведение 1:1. При больших разведениях увеличивается процент CD34+ клеток в мононуклеарной фракции до и после сепарации (96–99% против 91% при разведении 1:1), однако снижается жизнеспособность клеток (34% при разведении 1:3 против 75% при разведении 1:1). Концентрация клеток через трое суток культивирования возросла до  $8 \cdot 10^4 - 10^5$  кл/мл, причем процент CD34+ клеток составлял 100%. Из CD34+ клеток 80% являлись CD133+, КОЕ-тест показал, что на 7 день культивирования в метилцеллюлозной среде 85% составляют CFU-GM, 1.3% — CFU-M, 5.1% — CFU-G и 11.5% — BFU-E+CFU-E. Следует отметить появление к 7 дню культивирования фибробластоподобных клеток в колониях, что говорит о присутствии других стволовых и прогениторных клеток в препаратах. Таким образом, подобранные условия прободготовки позволили выделить гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) из свежей ПК с высокой степенью очистки (91-99%), с высоким пролиферативным потенциалом.

**Ключевые слова:** стволовые клетки, пуповинная кровь, ex vivo экспансия, CD34+ клетки

#### Введение

В мире, по различным оценкам, выполнено более 35 000 трансплантаций пуповинной крови (ТПК) для лечения больных с различными заболеваниями [1]. Образцы пуповинной крови (ПК) имеют высокую концентрацию мультилинейных гемопоэтических клеток-предшественников; однако, общий объем ПК невелик (как

правило, 60–100 мл), что приводит к задержке восстановления кроветворения [2]. Известно, что высокая доза общего количества ядродержащих клеток (ОЯК) и большое количество CD34+ клеток в трансплантате ПК повышают вероятность успешного приживления [3]. Общепринято, что доза клеток определяется с учетом массы тела (в кг) реципиента. В то время как у маленьких детей при трансплантации ПК может быть достигнута высокая доза клеток ПК, то у взрослых достаточная доза клеток ПК может быть достигнута не всегда. Таким образом, необходимы новые стратегии по ускорению и обеспечению приживления [4]. Одним из основных подходов к улучшению приживления ПК является культивирование (экспансия) ПК ex vivo, чтобы получить большее количество гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) перед трансплантацией.

В Покровском Банке Стволовых Клеток (ПБСК) ведется работа по подбору условий для роста в культуре ГСК, выделяемых как из свежего, так и из размороженного концентрата ПК. Основными требованиями, предъявляемыми при этом к культуре, являются: 1) увеличение числа клеток, 2) сохранение стволовости, 3) сохранение кариотипа (отсутствие хромосомных перестроек).

#### Цели работы

Подобрать условия выделения и очистки, а также культивирования ГСК, полученных из свежей ПК, для увеличения их количества, при сохранении стволовости.

#### Материалы и методы

##### *Препараты пуповинной крови*

ГСК выделяли из образцов ПК (n=18), предназначенных для утилизации по причине непригодности для хранения (малый объем образца, низкое количество лейкоцитов) или отказа пациентки от хранения.

##### *Выделение ГСК*

Использовался метод выделения мононуклеарной фракции на градиенте фиколла с последующей сепарацией с использованием конъюгированных с магнитными частицами антител к поверхностному маркеру CD34 (Miltenyi Biotec, Германия). В процессе отработки методики выделения мононуклеарной фракции в гра-

диенте фикола тестировали

а) влияние коэффициента разведения ПК буфером PBS (HyClone), содержащим 0,02% ЭДТА. Рекомендуемые в литературе разведения варьируют от 1:1 до 1:4,

б) влияние используемого при разведении буфера (раствор Хэнкса, HyClone+0,02%ЭДТА или PBS+0,02% ЭДТА) на чистоту выделения и жизнеспособность клеток. Многие исследователи считают, что использование раствора Хэнкса ухудшает чистоту выделения, но повышает число жизнеспособных клеток.

Неразведенные или разведенные буфером PBS или Хэнкса, содержащими 0,02% ЭДТА образцы ПК (35 мл) наслаивали на 15 мл фикола (Панэко, Россия) в 50 мл пластиковых пробирках (TPP, Швейцария) и центрифугировали при 400g 35 минут. Далее удаляли 1/3–1/2 верхней фазы и затем отбирали интерфазную фракцию, содержащую мононуклеарные клетки. К отобранному объему добавляли PBS, содержащий 0,02% ЭДТА до объема 5–10 мл (в зависимости от отобранного объема) и центрифугировали 10 мин при 300g. Очистку CD34+ клеток с помощью набора CD34MicroBeads (Miltenyi Biotec, Германия) проводили согласно протоколу производителя. Далее фракции клеток, не связавшихся с колонкой до и после сепарации, центрифугировали, ресуспендировали каждую фракцию в объеме 500 мкл и анализировали методом проточной цитометрии с помощью флуоресцентно меченых антител к CD34.

#### Культивирование ГСК

Количество клеток рассчитывали согласно данным проточной цитометрии. Клетки (104/мл) высевали на культуральные 6-луночные планшеты (TPP, Швейцария). В качестве фидерного слоя использовали мезенхимальные стволовые клетки. Клетки культивировали в среде IMDM, содержащей 20% заменителя сыворотки ВIT 9500, 10 ед пенициллина, 10 мкг стрептомицина. Ранее нами уже была подобрана оптимальная концентрация цитокинов: фактора стволовых клеток (100 нг/мкл), интерлейкина 3 (5 нг/мкл) и 6 (10 нг/мкл), а также тромбopoэтина (50 нг/мкл) [5].

#### Анализ колониеобразующей активности (КОЕ-анализ) ГСК

Морфологический анализ колоний ГСК, растущих в метилцеллюлозной цитокинсодержащей среде, проводили согласно общепринятым методикам и внутреннему протоколу ПБСК.

#### Проточная цитометрия

Процент CD34+ и CD34+CD133+ клеток оценивали методом проточной цитометрии согласно протоколам производителей и внутренним СОП ПБСК (СОП№3). Для окраски использовали антитела к CD34 (BD Biosciences) и CD133 (Miltenyi Biotec). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью флуоресцентного красителя 7-амино-актиномицина D (7-AAD).

#### Результаты

Подбор методов пробоподготовки свежей ПК для выделения мононуклеарной фракции

Сравнение процентного содержания ГСК в мононуклеарной фракции при использовании двух буферов (PBS и Хэнкса) показало, что в буфере PBS количество выделяемых клеток и их жизнеспособность незначительно выше, чем при использовании буфера Хэнкса (рис. 1), далее было решено использовать буфер PBS+0.02% ЭДТА

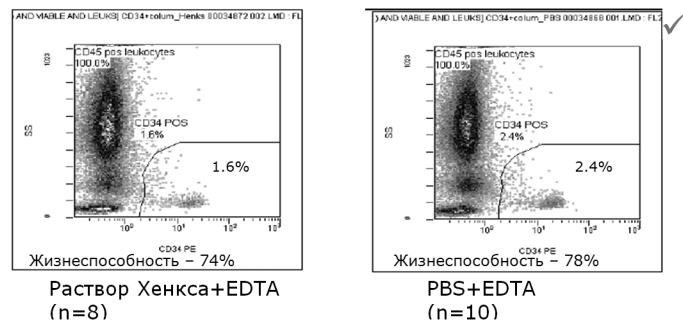


Рис. 1. Содержание ГСК (CD34 POS на графиках) и их жизнеспособность в мононуклеарной фракции в зависимости от используемого для разведения буфера.

При подборе коэффициента разведения препаратов ПК (рис. 2)

установлено, что оптимальным для буфера PBS+0.02% ЭДТА перед центрифугированием на фиколе является 1:1. При больших разведениях увеличивается процент CD34+ клеток в мононуклеарной фракции до (12.3% при разведении 1:3 и 4% при разведении 1:1) и после сепарации (96–99% против 91% при разведении 1:1). Однако при большем разведении снижается жизнеспособность клеток (34% при разведении 1:3 против 75% при разведении 1:1), вероятно, из-за снижения концентрации биологически активных веществ в клеточном окружении и изменения осмотических свойств среды. Кроме того, снижается общее количество клеток за счет потерь при манипуляциях. При использовании неразведенных препаратов ПК снижается чистота мононуклеарной фракции (с 93–95% лейкоцитов до 80–88%) и степень очистки клеток на магнитных колонках. Поэтому для дальнейших экспериментов был выбран коэффициент разведения 1:1.

Использование конъюгированных с магнитными частицами анти CD34 антител для выделения из мононуклеарной фракции CD34+ положительных клеток (т.е. ГСК) позволило повысить процент ГСК перед началом культивирования с 4 до 93% (рис.3).

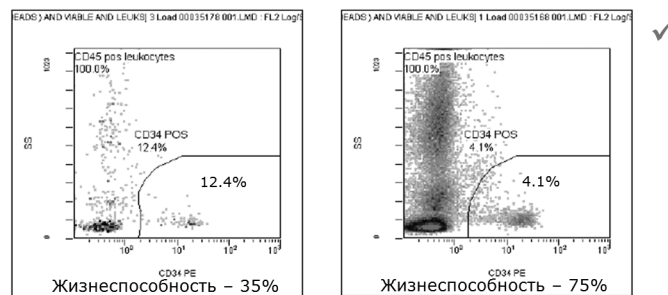


Рис. 2. Содержание ГСК (CD34 POS на графиках) и их жизнеспособность в мононуклеарной фракции в зависимости от коэффициента разведения ПК буфером PBS+0.02% ЭДТА.

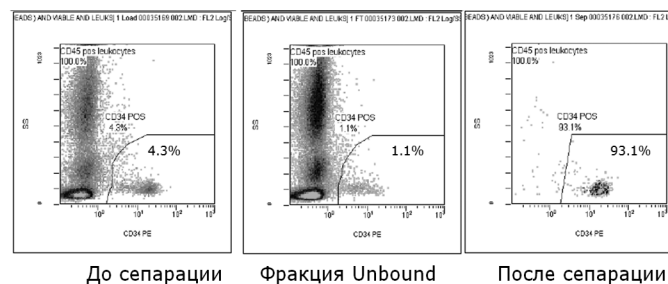


Рис. 3. Содержание ГСК (CD34 POS на графиках) в мононуклеарной фракции до и после сепарации, а также во фракции клеток, не иммобилизованных на колонке (Unbound)

Концентрация клеток при начале культивирования составляла  $10^4$ /мл. Через трое суток концентрация клеток возросла до  $8 \cdot 10^4$ – $10^5$  кл/мл. Процент CD34+ клеток составлял 100% (91% при начале культивирования), при этом в популяции культивируемых несепарированных клеток мононуклеарной фракции этот процент составлял 15% (4% при начале культивирования). Через 7 дней процент CD34+ клеток составлял 96%, однако в некоторых чашках снижался до 50–70%. Из CD34+ клеток 80% являлись CD133+, т.е. несли на своей поверхности маркер, позволяющий определить еще более узкий пул CD34+ клеток (CD34bright). КОЕ-тест показал, что на 7 день культивирования в метилцеллюлозной среде 85% составляют CFU-GM, 1,3% — CFU-M, 5,1% — CFU-G и 11,5% — BFU-E+CFU-E. Следует отметить появление к 7 дню культивирования фибробластоподобных клеток в колониях. Это говорит о присутствии других стволовых и прогениторных клеток в препаратах. По нашим данным, 4–9% клеток после сепарации не несли на поверхности маркер CD34. Кроме этого, CD34 может присутствовать на поверхности небольшой части популяций мезенхимальных стволовых клеток, эндотелиальных прогениторных клеток, дендритных клеток и некоторых других.

## Выводы

1. Подобранные условия пробоподготовки позволили выделить ГСК из свежей ПК с высокой степенью очистки (91–99%).
2. Полученные клетки сохраняют высокий пролиферативный потенциал.
3. В подобранных на сегодня условиях плюрипотентность сохраняется нестабильно, что может быть связано с отсутствием в среде цитокина Flt-3. В направлении сохранения плюрипотентности планируется вести дальнейшую работу.
4. Перспективным представляется изучение и овладение на практике методами выделения ГСК из замороженных образцов ПК с последующим культивированием.

## Обсуждение

На углубление понимания того, как выращивать, поддерживать и получать различные линии ГСПК были направлены работы таких исследователей как А.Я. Фриденштейн, Т.М. Dexter и D. Metcalf. Эти первичные исследования использовались E. Shpall в клиническом испытании [6], в котором оценивалось удобство цитокин-медирированной экспансии ПК у 37 пациентов, перенесших миелоаблативную трансплантацию ПК. Одна часть ранее замороженной ПК из двух (как правило, меньшая) культивировалась с цитокинами в течение 10 дней. Пациенты получили необработанную часть в день «0», а культивированную ПК либо одновременно (группа 1), или 10 дней спустя (группа 2). Данные, полученные в каждой группе, показали 56-кратное увеличение ОЯК и 4-кратное — CD34 + клеток. Медиана времени до приживления нейтрофилов и тромбоцитов составила 26 дней и 126 дней, соответственно; недостаточности трансплантата не наблюдалось. Четыре пациента умерли в течение 30 дней после приживления от инфекции. Результаты приживления в обеих группах статистически не различались. Острая РТПХ отмечалась у 20 из 30 обследованных пациентов (66,7 %) и хроническая РТПХ в 14 из 19 обследованных пациентов (74%). 12 из 37 пациентов были живы после медианы наблюдения 30 месяцев. Несмотря на небольшое число пациентов, это исследование показало, что ПК может культивироваться и безопасно вводиться пациентам, не приводя к отторжению трансплантата, кроме того, достигается значительное, по сравнению с историческим контролем, укорочение времени приживления (сокращение на 7–10 дней).

### *Культивирование, опосредованное хелатором меди*

Ранние наблюдения пациентов с дефицитом меди обнаружили сниженный гранулопоэз и эритропоэз, а биопсии костного мозга этих пациентов показали снижение количества зрелых гранулоцитов и увеличение количества промиелоцитов и миелоцитов по сравнению с пациентами без дефицита меди, так появилась гипотеза о том, что дефицит меди блокирует созревание миелоцита. Работа группы T. Peled показала, что можно снизить внутриклеточный уровень меди с помощью медного хелатора — тетраэтиленпентамина (ТЭПА) и увеличить продолжительность жизни CD34 + клеток, а также количество КОЕ. В дальнейшем, было показано, что CD34 + клетки ПК, подвергнутые воздействию ТЭПА, действительно имеют пониженную скорость дифференцировки и повышенную способность приживления в NOD / SCID мышшиной модели, что легло в основу клинического испытания.[7]

Перед экспансией и/или трансплантацией образцы ПК были заморожены двумя частями, в пределах от 50/50 до 20/80 долей. Наименьшую порцию затем размораживали, проводили селекцию CD133 + клеток для обогащения ГСПК и клетки культивировали в течение 21 дней с использованием коктейля цитокинов, содержащего ТЭПА. Экспансия привела к 161-кратному увеличению ОЯК (медиана). Количество CD34 + клеток в размороженном образце до экспансии не измерялось, но при измерении в необработанном образце и экстраполяции на порцию до культивирования, расчетная медиана экспансии CD34 + клеток составила 2,3-кратную. После подготовительного режима, пациенты получали необработанную часть ПК, а затем через 24 ч. культивированные клетки. Приживление было достигнуто у девяти из 10 пациентов с медианой времени до восстановления нейтрофилов 30 дней. У всех пациентов с приживлением наблюдался 100% химеризм. У четырех пациентов, развилась острая РТПХ кожи 2 ст., но острой РТПХ 3–4 степени не отмечалось. У четырех из восьми больных, про-

живших более 100 дней развилась хроническая РТПХ. Шесть из 10 пациентов были живы на 180 день (один умер от рецидива и три от инфекционных осложнений).

Это исследование показало, что ТЭПА-обработанная культивированная с цитокинами ПК может быть безопасно введена пациентам без увеличения безрецидивной смертности (на 100 день, по сравнению с историческим контролем). Ближится к завершению следующее исследование с включением 100 онкогематологических пациентов после аллогенной миелоаблативной трансплантации. Это исследование не рандомизировано для ТЭПА- культивирования, но может, тем не менее, обеспечить дополнительной информацией по эффективности ТЭПА - опосредованной экспансии на приживление одного образца ПК.

### *Платформа двойной ПК*

Еще одним подходом к увеличению количества ГСПК ПК для трансплантации является использование двух образцов донорской ПК. Дополнительным подтвержденным преимуществом использования платформы двойной ПК, является то, что один образец до заранее назначенного дня трансплантации может быть культивирован или обработан (например, усилен хоуминг), а другой образец остается необработанным. Эта стратегия также имеет уникальное преимущество отслеживаемости, так как обработанный образец генетически отличается от необработанного, по генам HLA позволяя отследить индивидуальный вклад каждого образца в химеризм (часто через определение коротких tandemных повторов). Кроме того, если обработанный продукт был поврежден или разрушен при процедуре, второй образец будет способен полностью восстановить кроветворение в одиночку, увеличивая безопасность клинического испытания.

Безопасность использования двух единиц ПК без экспансии была установлена, а итоговые результаты двойной трансплантации ПК, как было показано, сопоставимы с трансплантацией костного мозга от совместимых родственных и совместимых неродственных доноров. Несмотря на опасения, что две единицы ПК могут отрицательно реагировать друг против друга в реакции «трансплантат против трансплантата», такая реакция не наблюдалась. Как правило, после инфузии двух ПК, через 100 дней после пересадки преобладает один образец ПК. Многие исследования пытались предсказать, какая единица, в конечном счете, «выиграет», а данные указывают на то, что ранее приживление CD3 + клеток, наличие анти-HLA антител и высокая доза CD34 + клеток и ОЯК после размораживания может предсказать, какой образец ПК приживется. Идея, что одна или несколько субпопуляций клеток могут играть важную роль в прогнозировании приживления ПК должна служить ориентиром для будущих исследований экспансии и хоуминга ПК, а воздействие на ПК, несомненно, будет изменять состав клеточных субпопуляций в нем. Двойная трансплантация ПК является разумной альтернативой трансплантации одного образца ПК, если доза клеток ограничена или если нет совместимых доноров костного мозга.

### *Notch-опосредованная экспансия*

Семейство рецепторов Notch (Notch 1-4) и их лигандов (Jagged-1 и Jagged -2 и DLL 1, DLL3 и DLL4) играет разнообразную и ключевую роль в широком диапазоне биологических процессов: от развития органов до раковых метастазов. Также Notch 1 был обнаружен на CD34 + гемопоэтических клетках-предшественниках человека, после чего появилось предположение о его участии в кроветворении. Модель трансплантации двух образцов ПК, один из которых был необработанным, а второй — культивированным в присутствии DLL1ext-IgG использовалась в исследовании, где пациентам проводилась миелоаблативная трансплантация.[8]. В культивированной ПК отмечалось 562-кратное увеличение ОЯК и 164-кратное увеличение количества CD34 + клеток. Медиана времени приживления в том же учреждении, с использованием тех же режимов кондиционирования и посттрансплантационной иммуносупрессии заметно сократилась до 16 дней по сравнению с историческим контролем 26 дней. Важно отметить отсутствие инфузионных осложнений и приживление у девяти из 10 пациентов. Острая РТПХ 2 ст. наблюдалась у всех обследованных пациентов кроме одного и РТПХ 3ст. развилась у одного пациента.

Раннее миелоидное восстановление через 7 дней после транс-

плантации было практически полностью получено из культивированного образца ПК, хотя он и не сохранился через 14–21 дней после трансплантации. Исследователи предположили, что сокращение времени восстановления нейтрофилов предлагает потенциально облегчающий эффект, оказываемый *ex vivo* культивированными клетками на необработанный образец. Долговременное *in vivo* присутствие потомства от культивированных клеток трансплантата наблюдалось у двух из девяти оцениваемых пациентов. У одного пациента, при анализе на 240 день после трансплантации показали, что часть (10–15%) донорских клеток была из культивированного трансплантата; однако, через год после трансплантации, 100% гемопоэтических клеток были получены из необработанного образца. Отсутствие долговременного приживления в этом исследовании предполагает дефицит экспансии истинных кроветворных стволовых клеток, а также, что начало миелоидного восстановления было результатом краткосрочно репопулирующих клеток-предшественников.

#### **МСК-опосредованная экспансия**

В микроокружении костного мозга существует несколько ниш, в том числе эндотелиальная, периваскулярная, остеобластов и другие, с различными ролями в поддержании ГСК. Стратегии, использующие цитокины и/или Notch-лиганд, служат для имитации биологических механизмов роста и поддержки, происходящие в родном костномозговом окружении и регулируемые клетками ниши. Модель мезенхимальных стромальных клеток (МСК), полученных из негемопоэтической части костного мозга после *in vitro* культивирования в надлежащих условиях, является лучшей *ex vivo* моделью ниши. МСК секретируют большое количество цитокинов и лигандов, которые поддерживают рост и экспансию ГСПК, (CSF, GM-CSF, IL-6 и DLL1), что дает основание полагать, что стратегии цитокин-медиированного культивирования ПК основаны на естественном взаимодействии нишевых секретируемых факторов и ГСПК. В последних опубликованных клинических исследованиях МСК-опосредованной экспансии, [9] МСК культивировались из «готовых» мезенхимальных клеток-предшественников, повышая доступность клеток и их рост до количества, необходимых для со-культивирования с ПК в течение 4 дней. Первые результаты этого клинического испытания были зарегистрированы в исследовании с участием 31 пациента, перенесших миелоаблативную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Семь пациентов получили ПК, культивированную с МСК, полученными от членов семьи и 24 пациента получили ПК, культивированную на сторонних МСК; все пациенты также получили второй необработанный образец ПК. МСК-культивированная ПК показала 12,2-кратное увеличение ОЯК, 30,1-кратное увеличение CD34 + клеток и 17,5-кратное увеличение КОЕ-образования. Медиана времени приживления составила 15 дней, и у 23 из 24 пациентов, получивших ПК, культивированную на сторонних МСК зарегистрировано приживление (один пациент умер от раннего грибкового сепсиса до приживления); медиана времени до восстановления тромбоцитов — 42 дня. Ранний химеризм на 25–30 день у 54% пациентов был только от необработанного образца, в то время как у 46% химеризм от обоих образцов ПК. Через 6 месяцев, только у 13% пациентов регистрировался химеризм от культивированного образца, а через 1 год, у всех пациентов химеризм определялся преимущественно от необработанного образца. Частота острой РТПХ 2–4 степени была 42%, а 3–4 степени — 13%. Эти данные показывают, что МСК-культивированная ПК может, хотя и временно, прижиться и сделать это раньше, чем обычное приживление ПК.

#### **Никотинамид-опосредованная экспансия**

Никотинамид является формой витамина В3 и предшественником окисленного никотинамид-аденин-динуклеотида (НАД). Функция нескольких ферментов, а именно семейства сиртуина, зависит от НАД. Прототип семейства сиртуинов, SIRT1, обладает множеством биологических эффектов, включая клеточное деление, восстановление ДНК и др. в различных типах клеток, включая эндотелиальные, кардиальные и клетки скелетной мускулатуры. На основании ряда доклинических исследований, был разработан продукт для клинического применения NiCord® (Gamida-Cell, Израиль), проходящий I и II фазы клинических испытаний. Завершившееся пилотное исследование безопасности и эффек-

тивности у 11 взрослых после миелоаблативной двойной трансплантации ПК по поводу онкогематологических заболеваний, показало 486-кратное увеличение в ОЯК и 72-кратное увеличение количества CD34 + клеток после лечения одним образцом ПК с NiCord® плюс цитокины [10]. Медиана времени приживления составила 13 дней, у одного пациента развилась недостаточность трансплантата. У шести пациентов определялось долгосрочное миелоидное приживление только ПК, культивированной по методу NiCord®, и у одного пациента через 3 года после трансплантации наблюдался смешанный химеризм. Важным отличием испытания NiCord® от других испытаний является то, что из одного образца ПК выделялись для культивирования AC133 + клетки, имеющие, как известно, характеристики стволовых клеток, аналогичные CD34 + клеткам, которые затем криоконсервировались до трансплантации, когда они вводились совместно с культивированной ПК. Как и в других исследованиях, также вводилась и необработанная ПК. Это исследование является первым, показавшим, что культивированный продукт может иметь долгосрочное приживление у большинства пациентов, прошедших лечение. Биологическое действие вводимых неселективных AC133-клеток неизвестно, хотя можно предполагать, что там могут быть клеточные популяции (T-клетки и другие вспомогательные клетки), которые облегчают приживление обработанной (или, в теории, даже необработанной) ПК.

#### **SR1-опосредованная экспансия**

Исследование с использованием скрининга на основе анализа изображения выявило производное пурина, stem-regenin 1 (SR1), способствующее *ex vivo* экспансии ГСПК с помощью вовлечения арилуглеводородного рецептора. В скрининге с высокой пропускной способностью, использовались CD34 + клетки, полученные из мобилизованной периферической крови человека, которые культивировались в бессывороточной среде с тромбопоэтином, SCF, Flt3 лигандом и IL-6. Эти условия обеспечивали устойчивую пролиферацию, а также сопровождалась гемопоэтической дифференциацией и потерей активности приживления. Платформа двойной ТПК также использовалась для первого исследования на человеке с использованием SR1-опосредованной экспансии выделенных CD34 + клеток ПК у пациентов с миелоаблативной трансплантацией по поводу гематологических злокачественных новообразований. Стратегия была модифицирована — ранее собранная и криоконсервированная популяция CD34-клеток вводилась одновременно с отбором CD34+ клетки для культуры. Этот подход основан на доклинических наблюдениях над NOD/SCID/гамма мышами, культивированные клетки ПК у которых показывали улучшенное долгосрочное конкурентное преимущество при реинфузии CD34-клеток.

В отличие от результатов оригинальных стратегий экспансии, открытых в 1990-х и начале 2000-х годов, уже сейчас понятно, что на примитивные гемопоэтические клетки-предшественники можно воздействовать, то есть ГСК ПК можно культивировать, используя один из нескольких уникальных подходов (Табл. 1).

В настоящий момент все эти методики кажутся безопасными, без каких-либо наглядных побочных эффектов. Тем не менее, существуют ограничения для стратегий на основе экспансии. Во-первых, для культивирования требуется задержка в 10-14 дней, что не может быть приемлемо для пациентов со злокачественными новообразованиями высокого риска и нестойкой ремиссией. Во-вторых, за исключением исследования по NiCord®, в предыдущих исследованиях большинство пациентов, получивших образцы культивированной ПК продемонстрировали лишь кратковременное приживление.

И, наконец, затраты, связанные с манипуляциями с ПК могут быть значительными. Стоимость отдельного образца ПК зависит от конкретного банка клеток и от проведенных анализов. Лучшие оценки варьируют от US \$ 34000 до \$ 59000 для одного образца ПК, и удваиваются при выполнении двойной трансплантации ПК [11], [12]. Стоимость продуктов, используемых в настоящее время для манипуляций с ПК, пока неизвестна.

В перспективе, дальнейшее совершенствование протоколов экспансии ГСК ПК должно вести к сокращению сроков пребывания в стационаре, особенно в отделении интенсивной терапии — всемо, что будет способствовать снижению заболеваемости, ассоции-

рованной с трансплантацией, и приведет к улучшению результатов лечения пациентов.

Таблица 1

Сводный обзор результатов исследований культивирования пуповинной крови (медианы).

Стратегия	Экспансия (кратность)	Доза клеток (на кг массы тела)			Приживление (сутки)	РТПХ
		Без обработки	Обработанный	Общая		
С цитокинами (n=37) [6]	ОЯК: 56 CD34+: 4	ОЯК: 1,2×10 <sup>7</sup> CD34+: 7,4×10 <sup>4</sup>	н/д	ОЯК: 1,0×10 <sup>7</sup> CD34+: 10,4×10 <sup>4</sup>	N: 28 Plt: 108	II-IV ст. у 20 из 30 пациентов
ТЭПА (n=10) [7]	ОЯК: 161 CD34+: 2,3	ОЯК: н/д CD34+: 0,4×10 <sup>5</sup>	ОЯК: 0,6×10 <sup>6</sup> CD34+: 1,2×10 <sup>5</sup>	н/д	N: 30 Plt: 48	II ст. у 4 из 9 пациентов
Notch с DLL1 <sup>ext-1g6</sup> (n=10) [8]	ОЯК: 562 CD34+: 164	ОЯК: 3,3×10 <sup>7</sup> CD34+: 2,4×10 <sup>5</sup>	ОЯК: 4,6×10 <sup>7</sup> CD34+: 6×10 <sup>6</sup>	н/д	N: 16 Plt: н/д	II ст. у 10 пациентов
с МСК (n=31) [9]	ОЯК: 12,2 CD34+: 30,1	ОЯК: 2,3×10 <sup>7</sup> CD34+: 0,4×10 <sup>5</sup>	ОЯК: 5,8×10 <sup>7</sup> CD34+: 1,0×10 <sup>6</sup>	ОЯК: 8,3×10 <sup>7</sup> CD34+: 1,2×10 <sup>6</sup>	N: 15 Plt: 42	II-IV ст. у 13 пациентов
NiCord® (n=11) [10]	ОЯК: 486 CD34+: 72	ОЯК: 2,6×10 <sup>7</sup> CD34+: 0,6×10 <sup>5</sup>	ОЯК: 2,5×10 <sup>7</sup> CD34+: 3,5×10 <sup>6</sup>	н/д	N: 13 Plt: 33	II ст. у 5 пациентов

Примечания: ОЯК — общее количество ядросодержащих клеток, ТЭПА- тетраэтиленпентамин, н/д — данные отсутствуют, N — нейтрофилы, Plt — тромбоциты

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Kita K., Lee J. O., Finnerty C. C. et al. Cord blood derived hematopoietic stem/progenitor cells: current challenges in engraftment, infection, and ex vivo expansion // Stem Cells Int. 2011; 276193.
2. Broxmeyer H. E., Douglas G.W., Hangoc G. et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells // Proc. Natl Acad. Sci. USA 1989; 86: 3828–3832.
3. Avery S., Shi W., Lubin M. et al. Influence of infused cell dose and HLA match on engraftment after double unit cord blood allografts // Blood 2011; 117: 3277–3285.
4. Ballen K. K., Gluckman E., Broxmeyer H. E. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond // Blood 122, 491–498 (2013).
5. Айзенштадт А.А., Багаева В.В., Хрупина А.С. и соавт. Современные проблемы культивирования гематопозитических стволовых клеток пуповинной крови для трансплантации в онкогематологии и их решение // Вестник СЗГМУ им. И.И.Мечникова. 2012; №4(15): 12-18
6. Shpall E. J., Quinones R., Giller R. et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood // Biol. Blood Marrow Transplant 2002; 8: 368–376.
7. de Lima M., McManis G., Gee A. et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase I/II clinical trial // Bone Marrow Transplant. 2008; 41(9): 771–778 (2008).
8. Delaney C., Heimfeld G., Brashem-Stein C et al. Notch mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution // Nat. Med. 2010; 16: 232–236.
9. de Lima M., McNiece I., Robinson S.N. et al. Cord blood engraftment with ex vivo mesenchymal cell coculture // N. Engl. J. Med. 2012; 367: 2305–2315.
10. Horwitz M. E., Chao N.G., Rizzieri D.A. et al. Umbilical cord blood expansion with nicotinamide provides long term multilineage engraftment // J. Clin. Invest. 2014; 124, 3121–3128.
11. Bart T. Cost effectiveness of cord blood versus bone marrow and peripheral blood stem cells // Clinicoecon. Outcomes Res. 2010; 2: 141–147.
12. Majhail N. S., Mothukuri J.M., MacMillan M.L. et al. Costs

of pediatric allogeneic hematopoietic cell transplantation // Pediatr. Blood Cancer 2010; 54(1); 138–143.

Авторская справка

Иволгин Дмитрий Александрович

Научно-исследовательская лаборатория Клеточных технологий Северо-Западного Государственного Медицинского Университета им. И.И.Мечникова  
Российская Федерация, 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 45  
к.м.н., старший научный сотрудник, заведующий лабораторией выделения стволовых клеток ООО «Покровский Банк Стволовых Клеток»  
ida59m@mail.ru

Енукашвили Наталла Иосифовна

Научно-исследовательская лаборатория Клеточных технологий Северо-Западного Государственного Медицинского Университета им. И.И.Мечникова  
к.б.н., старший научный сотрудник, биолог ООО «Покровский Банк Стволовых Клеток»

Российская Федерация, 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 45  
natellae@gmail.com

Айзенштадт Александра Андреевна

Научно-исследовательская лаборатория Клеточных технологий Северо-Западного Государственного Медицинского Университета им. И.И.Мечникова  
научный сотрудник, заведующий лабораторией клеточных культур ООО «Покровский Банк Стволовых Клеток»  
Российская Федерация, 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 45  
aizendt@gmail.com

Адылов Шерзод Фархадович

ООО «Покровский Банк Стволовых Клеток»

генеральный директор

Российская Федерация, 199106, Санкт-Петербург, Большой пр. В.О., 85  
dr.adilov@hotmail.com

*Ivolgin D.A., Enukashvili N.I.,*

*Aizenshtadt A.A., Adylov S.F.*

## MODIFICATION OF HAEMOPOIETIC STEM CELLS ISOLATION AND PURIFICATION FOR SUBSEQUENT EXPANSION

North-Western State Medical University n.a. I. I. Mechnikov, SRL of cell technologies, Saint-Petersburg, Russian Federation;

Stem Cell Bank Pokrovskij, Saint-Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Umbilical cord blood derived stem cells (UCB SC) expansion is one of the promising areas for improving engraftment and thus enhance the effectiveness of therapy. The goal of this work is the selection of a number of conditions for the successful cultivation. The coefficient of USB dilution with PBS (HyClone) buffer, containing 0.02% EDTA, as well as the effect of the dilution buffer (Hanks' solution, HyClone + 0.02% EDTA and PBS + 0.02% EDTA) application influence on separation purity and viability of cells isolated from 18 USB samples and cultured was examined. When selecting the dilution factor for UCB it was found that for PBS + 0.02% EDTA buffer before centrifugation on Ficoll the optimal one is 1:1. In case of the larger dilution CD34 + cells percentage in the mononuclear fraction before and after the separation (96–99% vs. 91% at a dilution of 1: 1) increases, but cell viability reduced (34% at a dilution of 1: 3, compared to 75% at a dilution of 1:1). The cell concentration after three days of cultivation increased to  $8 \cdot 10^4$ - $10^5$  cells / ml, with the percentage of CD34 + cells of 100%. 80% of CD34 + cells were CD133 + and CFU-test showed that 85% from them on expansion day 7 in methylcellulose medium were CFU-GM, 1.3% — CFU-M, 5.1% — CFU-G and 11.5% — BFU-E + CFU -E. It should be noted the appearance of a fibroblast-like cells in the colonies on the 7 day of cultivation, indicating the presence of other types of stem and progenitor cells in the specimens. Thus, sample preparation conditions chosen enabled to isolate hematopoietic stem cells (HSCs) from fresh UCB with high purity level (91–99%) and high proliferative potential.

**Keywords:** stem cells, umbilical cord blood, ex vivo expansion, CD34+ cells

## REFERENCES

1. Kita K., Lee J. O., Finnerty C. C. et al. Cord blood derived hematopoietic stem/progenitor cells: current challenges in engraftment, infection, and ex vivo expansion. *Stem Cells Int.* 2011; 27:6193.
2. Broxmeyer H. E., Douglas G.W., Hangoc G. et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1989; 86: 3828–3832.
3. Avery S., Shi W., Lubin M. et al. Influence of infused cell dose and HLA match on engraftment after double unit cord blood allografts. *Blood* 2011; 117: 3277–3285.
4. Ballen K. K., Gluckman E., Broxmeyer H. E. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood* 122, 491–498 (2013).
5. Aizenshtadt A.A., Bagaeva V.V., Khyrupina A.S. et al. Modern problems of umbilical cord blood haemopoietic stem cells expansion for oncohaematological application and their solution. *Vestnik SZGMU im. I.I.Mechnikova.* 2012; №4(15): 12-18
6. Shpall E. J., Quinones R., Giller R. et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood. *Biol. Blood Marrow Transplant* 2002; 8: 368–376.
7. de Lima M., McManis G., Gee A. et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase I/II clinical trial. *Bone Marrow Transplant.* 2008; 41(9): 771–778 (2008).
8. Delaney C., Heimfeld G., Brashem-Stein C et al. Notch mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. *Nat. Med.* 2010; 16: 232–236.
9. de Lima M., McNiece I., Robinson S.N. et al. Cord blood engraftment with ex vivo mesenchymal cell coculture. *N. Engl. J. Med.* 2012; 367: 2305–2315.
10. Horwitz M. E., Chao N.G., Rizzieri D.A. et al. Umbilical cord blood expansion with nicotinamide provides long term multilineage

engraftment. *J. Clin. Invest.* 2014; 124, 3121–3128.

11. Bart T. Cost effectiveness of cord blood versus bone marrow and peripheral blood stem cells. *Clinicoecon. Outcomes Res.* 2010; 2: 141–147.
12. Majhail N. S., Mothukuri J.M., MacMillan M.L. et al. Costs of pediatric allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Pediatr. Blood Cancer* 2010; 54(1); 138–143.

## Authors

Ivlgin Dmitriy A.  
North-Western State Medical University n.a. I. I. Mechnikov  
PhD, Senior scientist, SRL of cell technologies; Head of stem cells isolation facility « Stem Cell Bank Pokrovskij »  
191015, Saint-Petersburg, Kirochnaya str., 45  
ida59m@mail.ru

Enukashvili Natella I.  
North-Western State Medical University n.a. I. I. Mechnikov

PhD, Senior scientist, SRL of cell technologies; Medical biologist « Stem Cell Bank Pokrovskij »  
Russian Federation, 191015, Saint-Petersburg, Kirochnaya str., 45  
natellae@gmail.com  
Aizenshtadt Alexandra A.  
North-Western State Medical University n.a. I. I. Mechnikov  
Research associate, SRL of cell technologies; Head of cells cultures facility « Stem Cell Bank Pokrovskij »  
Russian Federation, 191015, Saint-Petersburg, Kirochnaya str., 45  
aizendt@gmail.com

Adulov Sherzod F.  
CEO « Stem Cell Bank Pokrovskij »  
Russian Federation, 199106, Saint-Petersburg, Bolshoy pr. V.O., 85  
dr.adulov@hotmail.com

УДК 591.84:616-092.9

Макарова Э.Б., Захаров Ю.М., Осипенко А.В., Кудрявцева И.П., Рубштейн А.П., Корч М.А.  
**ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ  
НА ТИТАНОВЫХ МАТРИЦАХ С АЛМАЗОПОДОБНЫМ ПОКРЫТИЕМ  
IN VITRO И IN VIVO**

ФГБУ «УНИИТО им. В.Д. Чаплина, г. Екатеринбург, Российская Федерация;

Южно-Уральский государственный медицинский университет,

г. Челябинск, Российская Федерация;

ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет, г. Екатеринбург, Российская Федерация;

Институт физики металлов УрО РАН, г. Екатеринбург, Российская Федерация

**Резюме.** Цель данного исследования — оценить биосовместимость композитов «пористый титан — алмазоподобное покрытие» (ПТi(a-C)) в эксперименте. Эксперимент выполнен на 40 кроликах. *In vitro* выявлено отсутствие токсического влияния ПТi(a-C) на миелокариоциты кроликов. *In vivo* ПТi(a-C) обладает способностью активировать остеогенез особенно на ранних сроках наблюдения (4–16 недель после операции) по сравнению с пористым титаном без покрытия. Происходит увеличение количества остеогенных клеток, количества клеток, экспрессирующих щелочную фосфатазу в прооперированном сегменте кости. В результате при имплантации ПТi(a-C) образуется функционально более зрелая и прочная костная ткань.

**Ключевые слова:** титан, алмазоподобная пленка, костная ткань, регенерация

Распространенность титана и его сплавов в качестве материалов для изготовления костных имплантатов определяется его высокой коррозионной стойкостью и биотолерантностью [1]. Однако титан в тканях организма подвергается коррозии [2], его ионы в клинически значимых концентрациях снижают жизнеспособность остеобластов, остеокластов, эпителиальных клеток [3],

ингибируют экспрессию Runx2, Osterix в остеобластах, усиливают экспрессию RANKL и OPG в остеобластах и эпителиальных клетках [2]. Данные эффекты могут оказывать влияние на долговременную стабильность имплантатов. Один из способов повышения биосовместимости металлов — это модификация состава и структуры их поверхности. Нами для улучшения остеointegrативных свойств поверхность пористых титановых имплантатов была модифицирована углеродсодержащими алмазоподобными пленками, полученными методом импульсного дугового распыления графитовой мишени.

Исходя из вышесказанного, цель данного исследования — оценить биосовместимость композитов «пористый титан — алмазоподобное покрытие» (ПТi(a-C)) в эксперименте.

## Материалы и методы

Эксперимент *in vitro* выполнен с использованием 7 половозрелых кроликов стадного разведения, *in vivo* на 33-х кроликах. Все манипуляции с животными выполняли в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 10993.2-99.

*In vitro* оценивали способность к колониеобразованию и жизнеспособность миелокариоцитов, культивируемых в присут-