

ным матриксом паракринных факторов эндогенных гепатоцитов и их предшественников.

Исследования по применению МСК в терапии пациентов с тяжелой формой печеночной недостаточности, ожидающих трансплантации печени, начаты и в Республиканском центре трансплантации органов и тканей, перспективной задачей которого является расширение применения стволовых клеток для терапии различных состояний, в т. ч. и их применение в органной трансплантологии, а также создание новых стандартов лечения на основе стволовых клеток и активное внедрение этих высокотех-

нологичных методов терапии в практику здравоохранения.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Клеточные технологии при ишемической болезни сердца / А. Б. Смолянинов [и др.] // АГ-инфо. — 2006. — № 2. — С. 6–15.
2. Barry, F. P. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization / F. P. Barry, J. M. Murphy // Int. J. Biochem. Cell. Biol. — 2004. — Vol. 36. — P. 568–584.
3. Gilgenkrantz, H. Mesenchymal stem cells: an alternative source of hepatocytes / H. Gilgenkrantz // Hepatology. — 2004. — Vol. 40. — P. 1256–1259.
4. Anti-inflammation role for mesenchymal stem cells transplantation in myocardial infarction / J. Guo [et al.] // Inflammation. — 2007. — Vol. 30(3–4). — P. 97–104.
5. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation / W. T. Tse [et al.] // Transplantation. — 2003. — Vol. 75. — P. 389–397.

УДК 611.018.26:616-006.3]:615.324

### ТРАНСПЛАНТАТ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ: ПОЛУЧЕНИЕ, СТАНДАРТИЗАЦИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

С. И. Кривенко, Е. А. Назарова, Е. А. Селезнева, А. А. Коритко,  
Н. И. Дедюля, А. Л. Усс, В. В. Смольникова, Е. С. Бузук

9-я городская клиническая больница, г. Минск

В работе определены стандартные условия получения трансплантата мезенхимальных стволовых клеток (МСК) из жировой ткани для клинического применения в качестве котрансплантата при аллогенных пересадках гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Для обеспечения безопасности трансплантата помимо контроля его качества, включающего морфологический и иммунофенотипический анализ, при паспортизации МСК обязательно являлись результаты микробиологических тестов и теста на жизнеспособность. При выдаче МСК жировой ткани (ЖТ) для терапии оформлялся паспорт, разработанный ранее для систематизации сведений о трансплантате. По данному протоколу было подготовлено для клинического применения 19 трансплантатов МСК ЖТ, успешно использованных в качестве ко-трансплантатов при аллогенной пересадке ГСК и в терапии РТПХ у пациентов с онкогематологической патологией в УЗ «9-я городская клиническая больница».

**Ключевые слова:** мезенхимальные стволовые клетки, жировая ткань, посевная концентрация, иммунофенотип, клеточный трансплантат.

### TRANSPLANT OF MESENCHYMAL STEM CELLS FROM ADIPOSE TISSUE: OBTAINMENT, STANDARTIZATION AND APPLICATION

S. I. Krivenko, E. A. Nazarova, E. A. Selesniova, A. A. Koritko,  
N. I. Dedyulya, A. L. Uss, V. V. Smolnikova, E. S. Buzuk

Municipal Clinical Hospital № 9, Minsk

The work determines the standard conditions for the obtainment of a transplant of mesenchymal stem cells from adipose tissue for the clinical application as co-transplant in allogenic transplantation of hemopoietic stem cells. To ensure the safety of the transplant besides its quality control, including morphologic and immunophenotypic tests, the results of microbiological tests and viability test were necessary in the categorization of mesenchymal stem cells. The registration certificate, devised earlier for the systematization of data on the transplant was drawn, when the mesenchymal stem cells from adipose tissue were distributed for the therapy. Nineteen transplants of the mesenchymal stem cells from the adipose tissue were prepared by this protocol for the clinical application. They were successfully used as co-transplants in the allogenic transplantation of hemopoietic stem cells and in the therapy of reaction Transplant Against Host in patients with oncohematological pathology in Minsk Municipal Clinical Hospital No.9.

**Key words:** mesenchymal stem cells, adipose tissue, inoculation concentration, immunophenotype, cell transplant.

МСК являются наиболее перспективным агентом для использования в клеточной терапии. Это связано с относительной простотой культивирования этой популяции стволовых клеток, с их

плюрипотентностью, способностью к самоподдержанию, высоким пролиферативным потенциалом, а также с низкой иммуногенностью и иммуносупрессивными свойствами [3, 4, 5]. МСК спо-

способны дифференцироваться в клетки самых разных типов тканей взрослого организма, в т. ч. в мышечную и жировую ткани, клетки сосудистого эндотелия, нервные клетки, в кардиомиоциты, что дает право признать за ними большие возможности для практического здравоохранения [1].

Универсальным источником получения мезенхимальных стволовых клеток является костный мозг. Однако к настоящему времени накоплен достаточно большой материал, указывающий на целесообразность их выделения из ЖТ. МСК, полученные из ЖТ, обладают хорошим пролиферативным потенциалом и могут быть получены в большом количестве, практически без финансовых затрат на заготовку нужного материала.

#### **Цель исследования**

Определение условий получения трансплантата МСК из ЖТ, его стандартизация для последующего применения в качестве котрансплантата при аллогенных пересадках ГСК.

Источником получения МСК послужили липоаспиранты здоровых доноров ( $n = 25$ ). Выделение клеток, их культивирование, морфологический анализ проводились по ранее разработанному протоколу [2]. Принадлежность выделенных клеток к мезенхимальным стволовым оценивали методом проточной цитофлуориметрии с использованием следующей панели моноклональных антител (МКАТ): CD 45 PE 7, CD 34 APC, CD 105 PE, CD 90 FITC, CD 13 PE (Beckman Coulter, Великобритания). Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета программ «Statistica» 6.0 непараметрическим методом Уилкоксона и корреляционным анализом по Спирмену. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

Для определения оптимальной посевной концентрации клеток мононуклеарной фракции, обеспечивающей максимальный выход МСК,

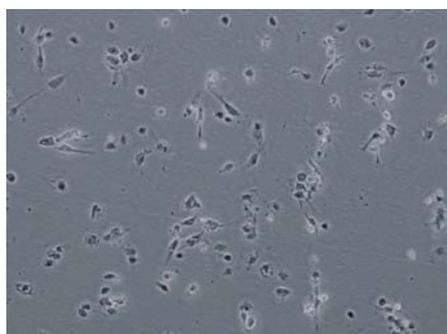
проанализированы данные культивирования 25 культур, отличавшихся исходной концентрацией клеток в первичной культуре. Все образцы ( $n = 25$ ) были распределены на 3 группы в зависимости от посевной концентрации мононуклеарных клеток на  $\text{см}^2$  площади дна культурального флакона: 1-я группа — до  $100 \times 10^3/\text{см}^2$  ( $n = 4$ ); 2-я группа — от 100 до  $300 \times 10^3/\text{см}^2$  ( $n = 10$ ) и 3-я группа — более  $300 \times 10^3/\text{см}^2$  ( $n = 9$ ).

Анализ полученных данных не выявил статистически значимых изменений ( $p > 0,05$ ) (критерий Уилкоксона) выхода МСК ЖТ на стадии P0 при использовании разных посевных концентраций мононуклеарных клеток (в группах сравнения 1 и 2 —  $p = 0,47$ ; в группах 1 и 3 —  $p = 0,47$ ; в группах 2 и 3 —  $p = 0,77$ ).

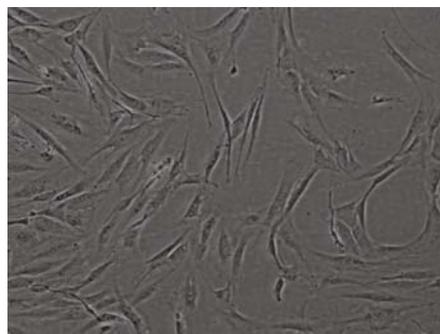
Также не было установлено достоверной корреляционной связи между посевной концентрацией мононуклеаров и количеством клеток, полученным на стадии первичной культуры в группе 1 ( $R_s = 0,8$ ;  $p = 0,2$ ), в группе 2 ( $R_s = 0,12$ ;  $p = 0,75$ ) и в группе 3 ( $R_s = -0,47$ ;  $p = 0,21$ ) (корреляционный анализ по Спирмену).

Следовательно, увеличение посевной концентрации мононуклеаров не гарантирует образования более плотного слоя адгезивных клеток и сокращения периода достижения 70–80 % конfluence в P0. В связи с этим, нами при получении трансплантата МСК в клинических условиях был установлен достаточно широкий диапазон для данного показателя: от  $100 \times 10^3$  до  $300 \times 10^3$  [2].

При морфологическом анализе исследуемых 25 культур МСК ЖТ уже в первые дни культивирования во многих образцах клетки постепенно приобретали характерную для МСК морфологию (имели вытянутую, веретенообразную форму) (рисунок 1).



а



б

**Рисунок 1 — Морфология клеток на первый и четвертый день культивирования. Пассаж P0:  
а — МСК ЖТ (1-й день в культуре)  $\times 100$ , ФК; б — МСК ЖТ (4 дня в культуре)  $\times 100$ , ФК**

В первичной культуре 90–100 % конfluence достигалась через 6–11 дней после их посева. Клетки имели специфическую направленность,

образуя т. н. «рыбьи косяки», типичные для монослоя в культуре МСК. Незначительные различия в достижении высокой степени конfluence мо-

гут быть связаны с индивидуальными особенностями ЖТ донора.

В процессе дальнейшего культивирования на пассажах P<sub>1</sub>–P<sub>2</sub> морфологические характеристики большинства культур практически не изменялись. Тем не менее, период образования монослоя (достижения 100 % конfluence) увеличивался от пассажа к пассажи (в среднем от 6–11 дней на стадии первичной культуры до 22–25 стадии на P<sub>2</sub>–P<sub>3</sub>).

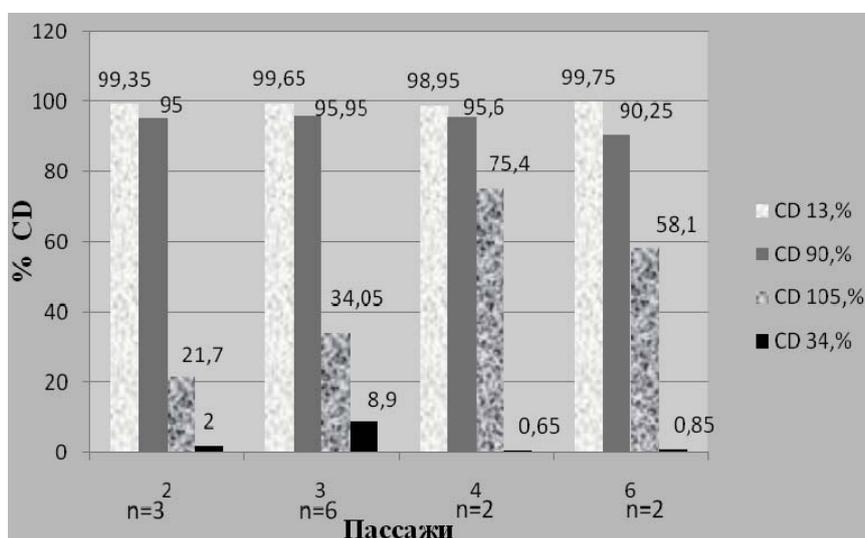
Наряду с морфологическим анализом культивируемых клеток трансплантат (n = 19 с средней клеточностью 20,40 млн — 3,61; 146,00) оценивался по следующим критериям:

- 1) оценка жизнеспособности по исключению трипанового синего;
- 2) контроль стерильности образца;
- 3) определение иммунофенотипа МСК.

Экспрессия маркеров клеточной поверхности (CD 90, CD 105, CD 13, CD 34, CD 45, HLA-

DR) МСК ЖТ исследовалась в процессе культивирования на разных пассажах.

На рисунке 2 представлены изменения экспрессии поверхностных маркеров в зависимости от стадии культивирования. На ранних этапах культивирования (P<sub>1</sub>–P<sub>3</sub>) от 2 (0,6; 6,2) % до 8,9 (0,6; 21,9) % клеток экспрессировало маркер гемопоэтических стволовых клеток (CD 34). Однако на более поздних стадиях культивирования (P<sub>4</sub>–P<sub>6</sub>) клетки приобретали более гомогенный профиль с постоянно высокими уровнями стромально-ассоциированных маркеров (CD 90, CD 105, CD 13) и низким уровнем CD 34. Все исследуемые клетки были негативны по маркерам CD 45 и HLA-DR, что является дополнительным свидетельством их низкой иммуногенности и возможности использования МСК ЖТ для аллогенной трансплантации без учета совместимости по тканевым антигенам.



**Рисунок 2 — Фенотипическая характеристика мезенхимальных стволовых клеток на протяжении всего периода культивирования (6 пассажей).**

*Примечание: уровень экспрессии поверхностных маркеров представлен значением медианы*

Для обеспечения безопасности трансплантата помимо контроля его качества, включающего морфологический и иммунофенотипический анализ, при паспортизации МСК для клинического применения обязательными являлись результаты микробиологических тестов и теста на жизнеспособность. При выдаче МСК ЖТ для терапии оформлялся паспорт, разработанный нами ранее для систематизации сведений о трансплантате. Наличие этого документа является обязательным при использовании стволовых клеток в практической деятельности учреждений здравоохранения.

В рамках данного исследования по разработанному протоколу было подготовлено для клинического применения 19 трансплантатов МСК ЖТ, успешно использованных в качестве ко-трансплантатов при аллогенной пересадке

ГСК и в терапии РТПХ у пациентов с онкогематологической патологией.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Костный мозг как источник получения мезенхимальных клеток для восстановительной терапии поврежденных органов / В. И. Шумаков [и др.] // Вест. трансплантологии и искусственных органов. — 2002. — № 4. — С. 3–6.
2. Порядок проведения тандемной аллогенной трансплантации гемопоэтических и мезенхимальных стволовых клеток у взрослых. Инструкция по применению: МЗ РБ № 003-0111 / А. Л. Усс [и др.]. — Минск, 2011. — 16 с.
3. Aggarwal, S. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses / S. Aggarwal, M. F. Pittenger // Blood. — 2005. — Vol. 105. — P. 1815–1822.
4. Chamberlain, G. Mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing / G. Chamberlain // Stem Cells. — 2007. — Vol. 25, № 11. — P. 2739–2749.
5. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow / Y. Jiang [et al.] // Nature. — 2002. — Vol. 418. — P. 41–49.