

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2015
УДК 618.14-002-02:618.7-073.43

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ
КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ДОНОРОВ ОРГАНОВ И ДОНОРОВ ТКАНЕЙ**

М.Ш. Хубутия, И.Н. Пономарев, О.И. Конюшко, М.С. Макаров, Н.В. Боровкова

НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, г. Москва

Цель работы: сравнение культуральных свойств пластикадгезирующих клеток, выделенных из костного мозга (КМ) доноров тканей и доноров органов, для оценки возможности использования клеток в клинической практике. Материалы и методы. Культуры пластикадгезирующих клеток из КМ трупов получали используя стандартные методы выделения, масштабирования и пассирования клеток. В культуре оценивали количество КОЕ-Ф, пролиферативную активность клеток, их соответствие минимальным международным критериям мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) и совместимость с аллогенными тканевыми трансплантатами. Результаты. В культурах клеток, полученных от доноров органов и доноров тканей количество КОЕ-Ф составляло 0,0004% и 0,00024%, а длительность фазы «пролиферативного покоя» 3-4 и 10-12 суток соответственно. Все обследованные культуры клеток после второго пассажа приобретали высокую степень однородности, а клетки соответствовали минимальным критериям ММСК. Вывод: КМ доноров органов и доноров тканей можно использовать для получения ММСК, пригодных для создания комбинированных клеточно-тканевых конструкций.

Ключевые слова: костный мозг, доноры органов, доноры тканей, мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки.

Стволовые клетки, выделяемые из костного мозга (КМ), активно применяются в практическом здравоохранении. Опыт нашей работы показывает, что их местное применение у пациентов с обширными ранами сокращает продолжительность и способствует улучшению результатов лечения [2]. Стандартная процедура миелоаспирации подразумевает многократные проколы троакарком мягких тканей и кости, поэтому требует выполнения донору анестезиологического пособия, а так же восполнения ему кровопотери, равной количеству заготовленного биоматериала. В результате, объем наносимой травмы создает высокий риск возникновения осложнений [6]. При этом жесткие требования к соматическому состоянию доноров обуславливают

дефицит добровольцев и не позволяют выполнять забор КМ у некоторых групп пациентов.

По данным литературы, источником получения большого количества КМ могут быть доноры трупы (ДТ) – люди с констатированной смертью мозга или биологической смертью [4]. При смерти мозга, характеризующейся прекращением самостоятельного дыхания на фоне сохраненной сердечной деятельности, потенциальным донорам органов для обеспечения поступления кислорода к тканям проводят искусственную вентиляцию легких (ИВЛ). В случае биологической смерти человека возможность разрешения дефицита кислорода отсутствует, в результате формирующаяся гипоксия индуцирует процесс апоптоза клеток, что ог-

раничивает возможности использования тканей донора производством девитализированных аллотрансплантатов. Таким образом, разная степень насыщения тканей кислородом может отражаться на качестве клеток КМ. Поэтому для оценки возможности использования КМ доноров органов и доноров тканей в качестве источника получения мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) для клинической практики провели исследование, целью которого было сравнить культуральные свойства пластикадгезирующих клеток, выделяемых из КМ доноров трупов обоих типов.

Материалы и методы

Исследование провели на культурах клеток, полученных из костного мозга 6 доноров тканей и 4 доноров органов. Сбор биоматериала проводили в операционной с соблюдением правил асептики и антисептики. От доноров, находившихся в состоянии биологической смерти, КМ заготавливали в первые 6 часов после констатации смерти, от доноров со смертью мозга – в ходе операции эксплантации органов. Миелоаспирацию выполняли из крыльев подвздошных костей шприцами обработанными гепарином.

Получение культуры клеток проводили в условиях культурального блока. Ядросодержащие клетки из КМ выделяли методом центрифугирования в градиенте плотности с Lympholite-H (Cedarline, Канада). Полученные мононуклеары засеивали с плотностью 10^5 кл/см² в среде ДМЕМ, содержащей 20% эмбриональной телячьей сыворотки, в несколько флаконов с вентилируемыми крышками. Образцы инкубировали при стандартных условиях: температуре окружающей среде 37°C и концентрации углекислого газа в атмосфере CO₂-инкубатора 5%. Через 48 часов из флаконов удаляли культуральную жидкость с неприкрепившимися клетками, а к адгезировавшим на пластик – вносили ДМЕМ с 10% сыворотки. Последующие обновления среды проводили каждые 3-4 дня. Взаимодействие клеток с ростовой поверхностью и их пролиферативную активность оценивали в динамике с помощью светового микроскопа.

На 14 сутки культивирования определяли количество КОЕ-Ф. Для этого по одному флакону с клетками от каждого донора обрабатывали формалином, а затем культуру окрашивали азур-эозином по Романовскому-Гимза. За одну КОЕ-Ф при микроскопическом исследовании принимали колонию, содержащую более 50 клеток.

При накоплении и изучении пластикадгезирующих клеток биоматериал инкубировали в стандартных условиях. По достижению культурой 80-90% конfluenceности её перевивали с коэффициентом рассеивания 1:2. Всего клетки поддерживали на протяжении 6 пассажей. При каждом снятии клеток с пластика для оценки их соответствия минимальным международным критериям ММСК [7] в культуре определяли долю клеток с фенотипом CD45⁻CD34⁺CD90⁺CD105⁺ используя проточный цитометр (FC500, Beckman-Coulter).

На 3-4 пассаже клетки от каждого донора оценивали на способность дифференцироваться в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях. Образцы культивировали в стандартных индукционных средах в соответствии с протоколами, рекомендованными производителем (Invitrogen, США). Для оценки результатов клетки фиксировали формалином, а затем обрабатывали красителями подтверждающими дифференцировку: Alizarin Red S (остеогенная), LipidTOX (адипогенная), Сафранин О (хондрогенная).

Возможность использовать ММСК КМ ДТ в клинической практике оценивали в опытах по изготовлению клеточно-тканевых конструкций на основе аллогенных трансплантатов: кортикальной кости, бесклеточного дермального матрикса, биологической повязки из коллагена 1 типа. Образцы трансплантатов помещали в отдельные чашки Петри диаметром 3 см куда добавляли по 1 млн ММСК в 3 мл среды ДМЕМ с 10% концентрацией сыворотки. В результате суспензия полностью покрывала фрагменты тканей. Биоматериал инкубировали в стандартных условиях с обновлением среды каждые 3-4 дня. При формировании на дне чашки Петри монослоя

клеток 85-90% конфлюэнтности приступали к изучению клеточного компонента в составе трансплантатов. Для этого образцы тканей обрабатывали флюорохромными красителями по оригинальной методике витального окрашивания [3], которая позволяла визуализировать клетки и оценить их жизнеспособность [1]. Биологическую повязку из коллагена 1 типа дополнительно окрашивали толуидиновый синим.

Результаты и их обсуждение

Через 48 часов после посева, при первой смене среды во всех флаконах отмечали прикрепление к ростовой поверхности фибробластоподобных клеток. Однако клетки, выделенные из КМ доноров со смертью мозга, начинали активно делиться раньше, чем полученные от доноров с биологической смертью. Вполне возможно, это являлось следствием нахождением клеток, доноров с биологиче-

ской смертью, в условиях выраженного дефицита кислорода. В результате на «нулевом» пассаже время достижения культурой плотности 80-90% значительно различалось между образцами, заготовленными от доноров разных типов (Таблица 1). При этом, на последующих пассажах скорость удвоения клеточной популяции практически не отличалась между образцами, полученными от доноров органов и доноров тканей, и составляла в среднем 1-2 суток.

В образцах, полученных от доноров органов, так же формировалось больше крупных колоний, чем в выделенных из КМ доноров тканей (ДТ) (Таблица 1). При этом стоит отметить, что биоматериал от доноров, которым проводили ИВЛ на фоне сохранённой сердечной деятельности, по количеству КОЕ-Ф был сопоставим с образцами, заготовленными от здоровых доноров [4].

Таблица 1

Свойства культур, полученных из КМ доноров с констатированной смертью мозга и доноров, находившихся в состоянии биологической смерти

Параметр	Источник КМ	
	ДТ находившиеся в состоянии биологической смерти	ДТ с констатированной смертью мозга
Количество КОЕ-Ф, % (абс)	0,00024% (6±2)	0,0004% (10±4)
Длительность фазы «пролиферативного покоя», дни	10-12	3-4
Длительность формирования монослоя первичной культурой 85-90 конфлюэнтности, дни	24-28	14-16

Доля клеток с фенотипом CD45⁻CD34⁺CD90⁺CD105⁺ на первом пассаже в образцах, полученных от доноров органов, составляла 70,2±2,6%. При этом в культурах, выделенных из КМ доноров тканей, она была достоверно выше и соответствовала 85,3±2,8%. После второго пассажа однородность популяций клеток несколько выравнивалась, достигая 81,4±1,8% и 88,6±3,6%, соответственно. Большая концентрация клеток с фенотипом ММСК в культурах, полученных из КМ доноров с биологической смертью, вероятно, обусловлена выживанием в условиях выраженной гипоксии в основном прогенеторных клеток, находивших-

ся в состоянии покоя. В последующих генерациях (глубина исследования – 6 пассажей) концентрации клеток, экспрессировавших ММСК-специфические рецепторы, в среднем составляли 91-96%, вне зависимости от источника получения биоматериала.

Помещение пластикадгезирующих клеток, выделенных из КМ доноров органов и доноров тканей, в остеогенную индукционную среду всегда сопровождалось появлением в культуре внеклеточных скоплений кальция. К 21 суткам нерастворимые минеральные конгломераты покрывали практически всю культуру клеток, что свидетельствовало об их

трансформации в остеобласты (рис. 1 А-1 и Б-1). При использовании среды для адипогенной дифференцировки в цитоплазме фибробластоподобных клеток отмечали накопление липидных включений. В результате, к 14 суткам культура полностью состояла из адипоцитоподобных клеток, которые специфически окрашивались LipidTOX в красный цвет (рис. 1 А-2 и Б-2). Инкубированию образцов в хондрогенной индукционной среде всегда сопутствовало активное накопление внеклеточного матрикса, «замуровывавшего» клетки. При микроскопическом исследовании окрашенных препаратов в межклеточном веществе выявляли большое количество глюкозаминогликанов, типичное для хрящевой ткани (рис. 1 А-3 и Б-3). В контрольных образцах, культивированных без добавления факторов, вызывающих дифференцировку клеток, описанных изменений не отмечали. Таким образом способность клеток, выделенных из КМ доноров органов и доноров тканей, дифференцироваться в разных направлениях в совокупности с ранее описанными признаками, свидетельствовало об их принадлежности к ММСК.

При изготовлении клеточно-тканевых конструкций во всех опытах через 2-3 часа, после добавления ММСК КМ доноров органов и доноров тканей к тканевым трансплантатам, наблюдали адгезию клеток из суспензии на пластик. После распластывания на дне чашки Петри они начинали активно делиться. В результате к 6-7 суткам инкубирования культура достигала плотности 85-90%, что с учётом небольшой плотности посева было сравнимо со скоростью пролиферации клеток в исходной культуре. Это свидетельствовало об отсутствии негативного влияния на клетки аллогенных тканей.

После окрашивания кортикальной кости флюорохромным красителем ММСК, выделенные из КМ доноров органов и доноров тканей, выявляли только на одной стороне трансплантата, обращенной при инкубировании вверх. При этом плотности культур клеток на дне чашки Петри и кости были сопоставимы (рис. 2,

А-1 и Б-1). При оценке клеточного компонента в составе конструкций на основе дермального матрикса, колонии ММСК доноров трупов определяли на обеих сторонах трансплантата. При этом на поверхности, до децеллюляризации покрытой эпидермисом, клетки формировали монослой (рис. 2 А-2), а на обращенной к дерме – небольшие скопления между волокнами (рис. 2 Б-2). Биологическую повязку на основе коллагена I типа ММСК доноров органов и доноров тканей так же активно колонизировали, распределяясь между волокнами по всей толщине трансплантата (рис. 2 А-3, Б-3).

Заключение

Таким образом, используя только стандартные методы культивирования, из костного мозга доноров органов и доноров тканей получали культуры клеток, соответствующие минимальным критериям мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток. Однако в миелоаспирате от доноров со смертью мозга, находившихся на искусственной вентиляции легких, отмечали большую концентрацию КОЕ-Ф, а ядродержащие клетки имели меньшую продолжительность фазы «пролиферативного покоя». Вне зависимости от источника получения биоматериала, после первого пассажа скорость пролиферации клеток становилась одинаковой. После второго пассажа культуры клеток приобретали высокую степень однородности, которую поддерживали до конца исследования. На 3-4 пассаже клетки, выделенные из костного мозга доноров органов и доноров тканей, были способны дифференцироваться в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях.

При совмещении мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга доноров тканей с аллогенными тканевыми трансплантатами клетки сохраняли жизнеспособность, активно пролиферировали и колонизировали образцы тканей.

Обобщив полученные результаты, мы считаем, что костный мозг доноров органов и доноров тканей можно эффективно использовать для получения и накопления мультипотентных мезенхима-

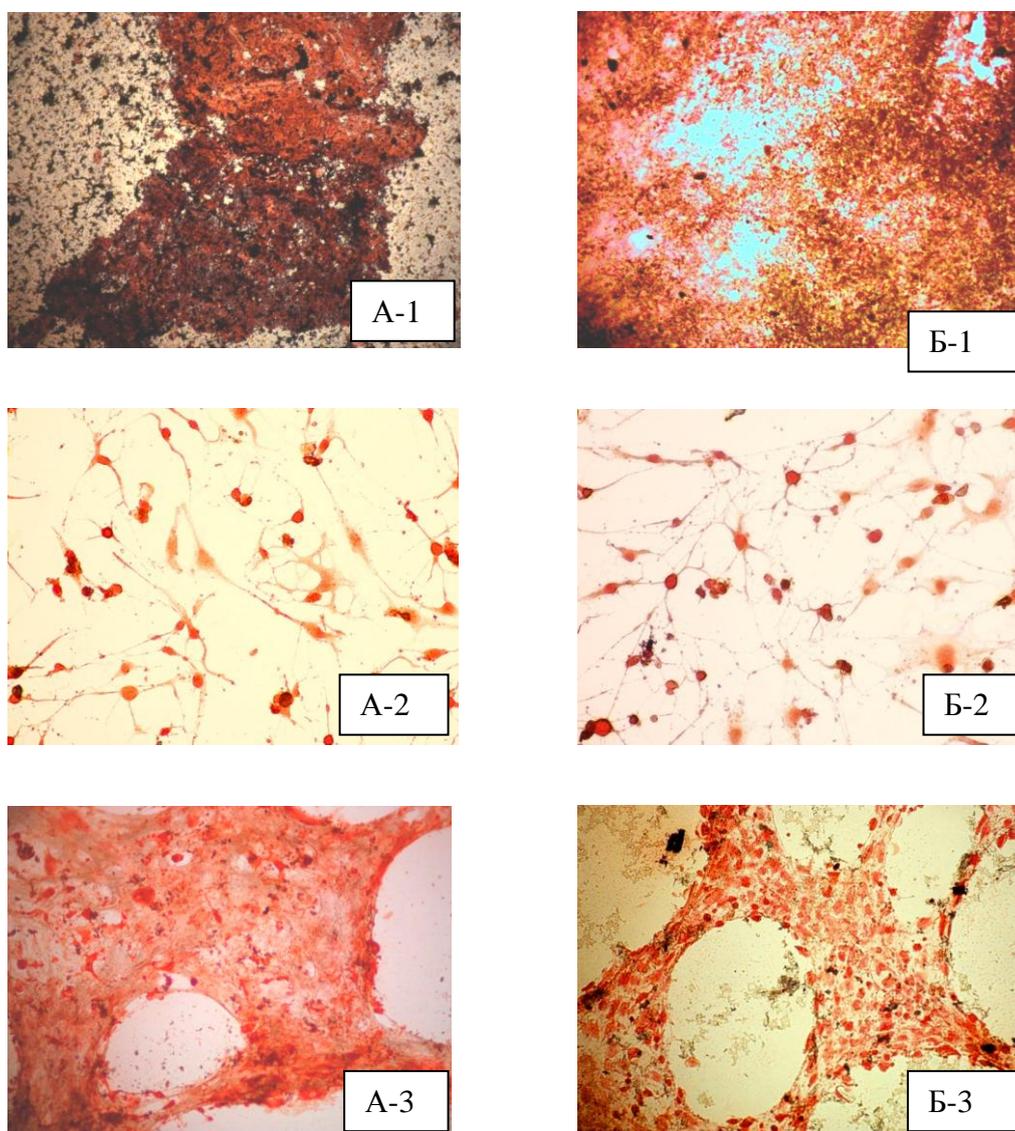


Рис. 1. Результат культивирования пластикадгезирующих клеток выделенных из КМ доноров тканей (А-) и доноров органов (Б-) в среде для индукции в остеогенном направлении (-1; Alizarin Red S; x40), адипогенном (-2; LipidTOX; x80), хондрогенном направлениях (-3; Д – Сафранин О, Е – Alcain Blue Stain; x40)

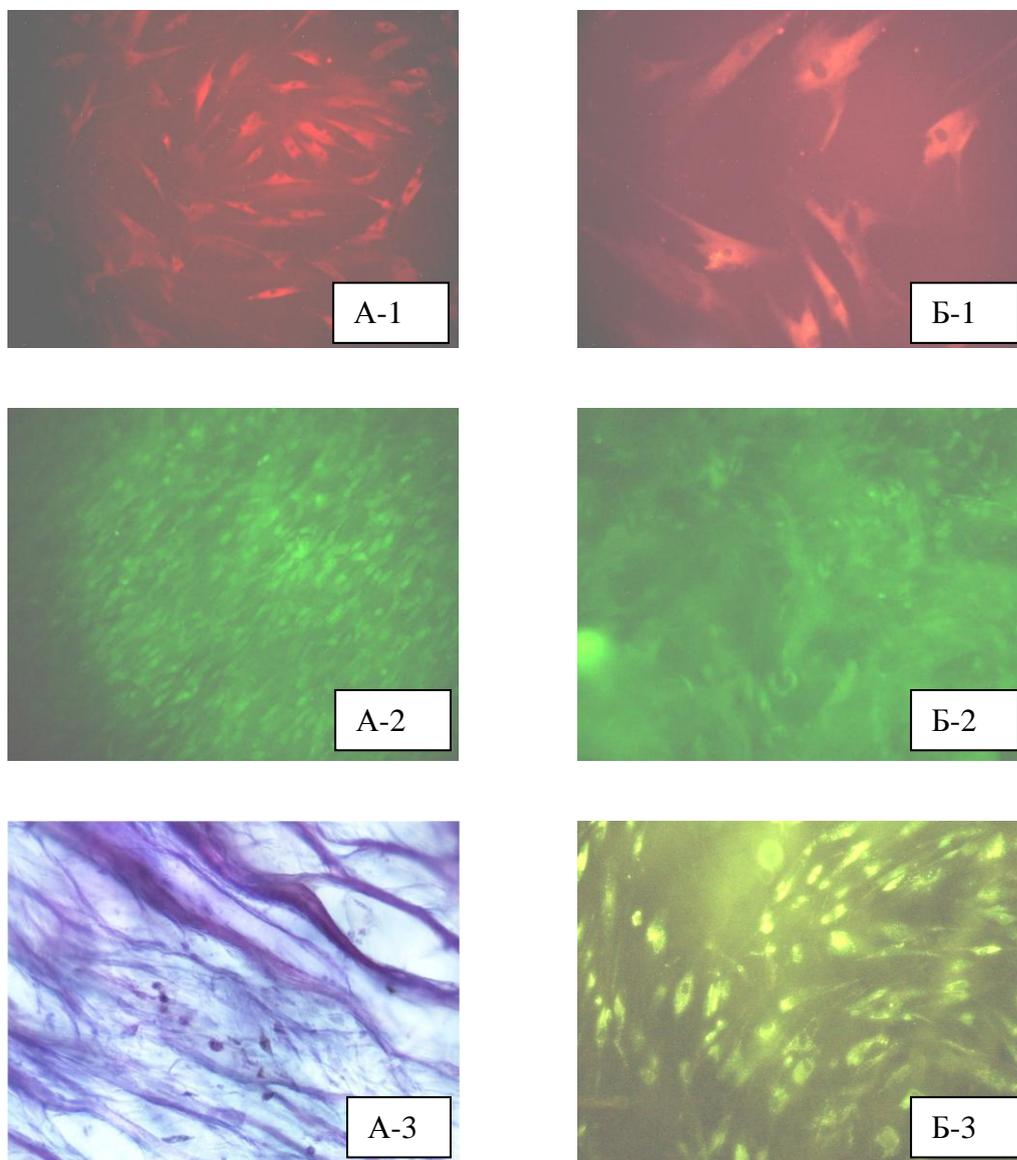


Рис. 2. ММСК КМ доноров тканей (А) и доноров органов (Б), окрашенные флюорохромными красителями, на аллогенных трансплантатах: кортикальной кости (А-1 – увеличение x100; Б1 – увеличение x200), бесклеточном дермальном матриксе (А-2 – субэпидермальная сторона, увеличение x80; Б-2 – дермальная сторона, увеличение x80), повязке на основе коллагена 1 типа человека (А-3 – толуидиновый синий, увеличение x60; Б-3 – увеличение x200)

льных стволовых клеток, пригодных для создания комбинированных клеточно-тканевых конструкций.

Литература

1. Макаров М.С. Оценка клеточного компонента биотрансплантатов с помощью витального окрашивания / М.С. Макаров, В.Б. Хватов // Медицинский алфавит. – 2014. – № 15. – С. 32-35.
2. Применение комбинации дермального матрикса с аллогенными клетками для лечения обширных травматических ран / М.Ш. Хубутия [и др.] // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2014. – № 1. – С. 107-113.
3. Пат. 2484472 Российская Федерация, МПК⁵¹ G01N 33/48 (2006.01) Метод морфофункциональной оценки клеточного компонента биотрансплантатов / М.С. Макаров [и др.]; патентообладатель Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы. – 2012114625/15; заявл. 13.04.2012; опубл. 10.06.2013, Бюл. № 16.
4. Cadaveric bone marrow as potential source of hematopoietic stem cells for transplantation / J. Michalova [et al.] // Chimerism. – 2011. – Vol. 2, № 3. – P. 86-87.
5. Delorme, B. Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells / B. Delorme, P. Charbord // Methods Mol. Med. – 2007. – Vol. 140. – P. 67-81.
6. Impact of stem cell donation modality on normal donor quality of life: a prospective randomized study / G.A. Kennedy [et al.] // Bone Marrow Transplant. – 2003. – Vol. 31, №11. – P. 1033-1035.
7. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici [et al.] // Cytotherapy. – 2006. – Vol. 8, №4. – P. 315-317.

COMPARATIVE CHARACTERISTICS CULTURAL PROPERTIES OF ADHERENT CELLS DERIVED FROM BONE MARROW OF MULTIORGAN DONORS AND TISSUES DONORS

M.Sh. Hubutija, I.N. Ponomarev, O.I. Konjushko, M.S. Makarov, N.V. Borovkova

Purpose of work – compare cultural properties of adherent cells derived from bone marrow of multiorgan donors and tissues donors, to assess the possibility of using these cells in clinical practice. **Materials and methods.** Adherent culture cells from cadavers bone marrow were obtained using standart methods of isolation, scaling, and passaging cells. In culture, counted the number of CFU-F, proliferating activity of cell, their complies with the minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells (hMSC) and compatibility with allogeneic tissue grafts. **The Results.** In cultures of cells derived from multiorgan donors and tissues donors the number of CFU-F was 0,0004% and 0,00024%, while the duration of the phase "rest proliferative" was 3-4 and 10-12 days respectively. All examined cell culture after the second passage have gained a high degree of homogeneity, and the cells were complies the minimum criteria hMSC. **Conclusion:** bone marrow of multiorgan donors and tissues donors can be used for obtain hMSC, suitable for creating a combined cellular-tissue grafts for clinical use.

Keywords: bone marrow, multiorgan donors, tissues donors, cadaver, multipotent mesenchymal stromal cells.

Хубутия М.Ш. – д.м.н., проф., член-корреспондент РАН, директор НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского.
г. Москва, Б. Сухаревская, д. 3.
E-mail: sklif@zdrav.mos.ru

Пономарев И.Н. – науч. сотрудник лаборатории трансплантации клеток и иммунотипирования НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского.
г. Москва, Б. Сухаревская, д. 3.
E-mail: rzam@yandex.ru

Конюшко О.И. – к.б.н., науч. сотрудник лаборатории трансфузиологии, консервирования тканей с группой искусственного питания НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского.
г. Москва, Б. Сухаревская, д. 3.
E-mail: sklif@zdrav.mos.ru

Макаров М.С. – к.б.н., мл. науч. сотрудник лаборатории трансплантации клеток и иммунотипирования НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского.
г. Москва, Б. Сухаревская, д. 3.
E-mail: sklif@zdrav.mos.ru

Боровкова Н.В. – д.м.н., зав. лабораторией трансплантации клеток и иммунотипирования, НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского.
г. Москва, Б. Сухаревская, д. 3.
E-mail: sklif@zdrav.mos.ru