

УДК: 616-005.4-092.4:611.73:57.083

© Карпенко Ю.І., Холодкова О.Л., Козлов В.П., Крижанівський Ю.М., Козлов Ю.В., 2012

ПОРІВНЯННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ СПОСОБІВ ВИГОТОВЛЕННЯ КЛІТИННОЇ СУМІШІ, ЩО МІСТИТЬ СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ, ДЛЯ ІНТРАМІОКАРДІАЛЬНОЇ ІМПЛАНТАЦІЇ

Карпенко Ю.І., Холодкова О.Л., Козлов В.П., Крижанівський Ю.М., Козлов Ю.В.

Одеський національний медичний університет

Карпенко Ю.І., Холодкова О.Л., Козлов В.П., Крижанівський Ю.М., Козлов Ю.В. Порівняння ефективності способів виготовлення клітинної зависі, що містить стовбурові клітини, для інтраміокардальної трансплантації // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 4. – С. 45-47.

В роботі розглянути різні методи отримання моноклеарної фракції клітин периферійної крові, що містить стовбурові клітини, для трансплантації в міокард при ішемічній кардіоміопатії. Показано, що найбільш ефективним методом процесінгу лейкоферезної зависі є центрифугування за допомогою градієнтів щільності фікол – гістопак.

Ключові слова: стовбурові клітини, інтраміокардальна імплантacja, ішемічна кардіоміопатія

Карпенко Ю.І., Холодкова Е.А., Козлов В.П., Крижанівський Ю.М., Козлов Ю.В. Сравнение эффективности способов приготовления клеточной взвеси, содержащей стволовые клетки, для интрамиокардиальной трансплантации // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 4. – С. 45-47.

В работе рассмотрены разные методы получения моноклеарной фракции клеток периферической крови, содержащей стволовые клетки, для трансплантации в миокард при ишемической кардиомиопатии. Показано, что наиболее эффективным методом процессинга лейкоферезной взвеси является центрифугирование в градиенте плотности фиколл – гистопак.

Ключевые слова: стволовые клетки, интрамиокардиальная имплантация, ишемическая кардиомиопатия.

Karpenko Yu.I., Kholodkova O.L., Kozlov V.P., Krizhanivskiy Yu., M., Kozlov Yu.V. Comparison of the cell suspension containing stem cells for the intramyocardial transplantation methods efficiency // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 4. – С. 45-47.

In the paper different methods of the mononuclear cell fraction of the peripheral blood containing stem cells preparation for the transplantation into the myocardium were observed. It was shown the most effective method of leucapheresis suspension processing was centrifugation with the ficoll – histopaque density gradient.

Key words: stem cells, intramyocardial implantation, ischemic cardiomyopathy

На даний час захворюваність і смертність від серцево-судинної патології залишається на високому рівні. Значну роль у цьому відіграє серцева недостатність. Серцева недостатність може розвиватися після перенесеного інфаркту міокарда, під впливом хронічної ішемії, або ідіопатичних причин що призводить до дилатації порожнин серця, клітинної гіпертрофії і ремоделювання екстрацелюлярного матриксу [1]. Важка серцева недостатність є однією з найчастіших причин смерті [2]. Основними методами лікування даної категорії пацієнтів, що існують на сьогоднішній день, є: медикаментозна терапія, пряма реваскуляризація (аортокоронарне шунтування або ангіопластика зі стентуванням) і трансплантація серця. Хірургічні методи лікування показали свою перевагу в порівнянні з ізольованою медикаментозною терапією. Але, на жаль, існує велика група пацієнтів, яким з тих чи інших причин (дистальна оклюзія, високий ризик операції, технічні проблеми) протипоказане виконання прямої реваскуляризації. Існує ряд невирішених питань щодо донорів та етичних моментів, що значно знижує можливість вчасно виконати трансплантацію серця [3].

На сьогоднішній день перспективною є ідея

регенерації пошкодженого судинного русла автологічними CD34⁺ стовбуровими клітинами периферійної крові (СКПК) або автологічними стовбуровими клітинами кісткового мозку (СККМ) [4], які здатні мультилінійно диференціюватися та самовідновлюватися [5].

Практичну зацікавленість світової науки викликають автологічні CD34⁺ СКПК, які входять до фракції ядровмісних клітин (ЯВК), після попередньої стимуляції їх виходу у периферійну кров гранулоцитарним колонієстимулюючим фактором (Гр-КСФ). Чисельними дослідженнями була підтверджена здатність СКПК диференціюватися у практично будь-які тканини організму, у тому числі й у кардіомиоцити [6, 7].

Беручи до уваги, що після стимуляції виходу стовбурових клітин у периферійну кров, вміст СКПК є дуже невеликим (2-4 % від загальної кількості лейкоцитів) необхідно знайти ефективні способи їх виділення.

Метою нашого дослідження було порівняти основні методи процесінгу периферійної крові для отримання зависі з ЯВК, що містять стовбурові клітини, для кардіоміопластики, а саме: виділення шляхом центрифугування на градієнтах щільності [8-18], седиментації за допомогою під-

роксетилкрохмалу (ГЕК) [19] та седиментації за допомогою гелофузину [20].

Матеріали і методи. У дослідження було включено 15 хворих на ішемічну кардіоміопатію, у яких були отримані аутологічні клітинні зависі, що містять СКПК, з наступною їх інтраміокардіальною імплантацією за допомогою навігаційної системи NOGA.XP та катетеру MuoStar. Пацієнтів було розподілено на три групи (n=5 у кожній групі).

У пацієнтів в усіх групах стимуляція виходу стовбурових та прогеніторних клітин з кісткового мозку у периферійну кров здійснювалася одноразовим призначенням колонієстимулюючого фактору Нейпоген (Філгратім) 48 млн ОД підшкірно. Усі пацієнти введення препарату перенесли задовільно. Осалгії спостерігалися у 3-ох пацієнтів з I групи, у 2-ох з II групи та 5-ох з III групи, у двох з яких було відмічено розвиток грипоподібної симптоматики.

Контроль відповіді на стимуляцію лейкопоезу здійснювався наступного дня шляхом оцінки ступеня підвищення кількості та появи молодих форм лейкоцитів у формулі периферійної крові.

Далі пацієнти підлягали процедурі двократно-го лейкоферезу за допомогою сепаратора клітин крові Fresenius COM.TEC. Середній об'єм отриманої лейкоферезної зависі дорівнював 162 ± 3 мл.

У I групі клітинну завись, що містить стовбурові клітини (КЗСК) з лейкоферезної зависі виділяли за допомогою центрифугування на градієнті щільності фікол-гістопак 1.077, у II – седиментацією з ГЕК, у III – седиментацією з гелофузином.

Виділення КЗСК за допомогою градієнту щільності здійснювали нашаруванням лейкоферезної зависі на фікол з наступним центрифугу-

ванням при 400g на протязі 40 хв. Отриману КЗСК з інтерфазного кільця ресуспендували у 20 мл фосфатного буфера за формулою Дюльбеко з наступним центрифугуванням при 100g з метою видалення фіколу та деплеції тромбоцитів. Процедуру повторювали двічі.

КЗСК з лейкоферезної зависі у II та III групах виділяли шляхом додавання до лейкоферезної зависі ГЕК та гелофузину відповідно. Після седиментації еритроцитів надосад центрифугували, отримували осад, який складався з КЗСК.

Для діагностики якості клітинних трансплантатів (КТ) *in vitro* застосовувались наступні методи: підрахунок кількості лейкоцитів та еритроцитів у камері Горяєва методом світлової мікроскопії, визначення відносної кількості ЯВК у КЗСК в мазках, забарвлених за методом Романовського – Гімза, підрахунок кількості життєздатних клітин за забарвленням трипановим – синім концентрацією 0,4 % (Sigma – Aldrich, Великобританія).

Результати та обговорення. В усіх групах пацієнтів на наступний день після введення Гр-КСФ відзначалася значна стимуляція лейкопоезу. Середній приріст кількості лейкоцитів у I групі був 22×10^9 , у II – 21×10^9 , у III – 23×10^9 .

Процесінг лейкоферезної зависі I групи займав в середньому 1 год 53 хв, II – 1 год 32 хв, III – 52 хв. Кінцевий об'єм КТ в усіх групах склав $6 \pm 0,3$ мл. Макроскопічно КТ у I групі були молочного кольору, у II – рожевого, у III – білого рожевого. Лабораторна діагностика показала, що концентрація клітин була максимальною у III групі (табл.). КТ I групи містили мінімальну кількість гранулоцитів (5 % від загальної кількості ЯВК у зависі) та еритроцитів ($0,1 \times 10^9$ у мл). Життєздатність клітин у КТ усіх груп суттєво не відрізнялася і складала $98 \pm 0,1$ %.

Таблиця. Порівняльна характеристика клітинних трансплантатів

Групи хворих	Середня кількість ЯВК (млн/ мл)	Відносна кількість (%) мононуклеарних клітин в 1 мл	Кількість еритроцитів в 1 мл	Кількість життєздатних клітин (%)
I	198	95	$0,1 \times 10^9$	98
II	201	72	$1,0 \times 10^9$	97
III	250	73	$0,7 \times 10^9$	98

Отримані нами дані демонструють, що найбільш селективним методом виділення КЗСК є центрифугування за допомогою градієнтів щільності. КТ I групи, що були отримані за цим методом, містили найбільшу кількість мононуклеарних клітин та найменшу кількість гранулоцитів та еритроцитів. Але, цей метод є досить складним у виконанні та потребує великий проміжок часу.

Найбільш швидким методом виділення ЯВК є седиментація за допомогою гелофузину. Перевагами цього методу є швидкість та зручність у виконанні, можливість використання цього методу для процесінгу первинного анатомічного матеріалу малої кількості з низькою щільністю клітин, де суттєвим є отримання максимальної кількості ЯВК у КТ. Головним недоліком цього способу є те, що КТ містять великий домішок гранулоцитів та еритроцитів.

У ході дослідження було показано, що процесінг лейкоферезної зависі за допомогою ГЕК є найменш ефективним способом.

Також, було показано, що одноразове введення Гр-КСФ є безпечним для хворих на ішемічну кардіоміопатію та достатнє для стимуляції лейкопоезу.

Висновки: Застосування однократного введення Гр-КСФ хворим на ішемічну кардіоміопатію не викликає суттєвих бічних ефектів та є достатнім для стимуляції лейкопоезу. Лейкоферез за допомогою сепаратора клітин крові Fresenius COM.TEC є безпечною та ефективною процедурою отримання первинного анатомічного матеріалу (лейкоферезної зависі). Найбільш ефективним методом процесінгу лейкоферезної зависі є центрифугування за допомогою градієнтів щільності фікол – гістопак.

Отримання клітинної завісі, що містить стовбурові клітини, з первинного анатомічного матеріалу шляхом седиментації з гелофузином доцільно використовувати при малому об'ємі клітинного трансплантата та низьким вмістом клітин у ньому.

Перспективи подальших досліджень. Для розуміння механізмів, що діють, при кардіоміопластичці існує необхідність характеристики матеріалу клітинного трансплантату (фенотипування за кластерами диференціювання). Крім того, є необхідність в експериментальній перевірці ефективності клітинної завісі, що вводиться, з використанням різних методів її виготовлення.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Передерий В.Г. Основы внутренней медицины / В. Г. Передерий, С. М. Ткач. – М.: Нова Книга, 2009, Т.2 – С.112-117.
2. Braunwald E. Heart Disease, 8-th edition / E. Braunwald. - M.: Saunders, 2008. – 228 p.
3. Annarosa L. Cardiovascular Regeneration and Stem cell Therapy / L. Annarosa, A. Piero, William H. Frisman // Blackwell future. - 2007. - P.37-38.
4. Losordo W. Intramyocardial Transplantation of Autologous CD34+ Stem Cells for Intractable Angina / W. Losordo, R. A. Schatz // Circulation. - 2007. - Vol. 115. - P.3165-3172.
5. Chertkov J.L. / Int.Rev.Cytol. – 1986. – Vol.112.- P. 271 - 313.
6. Волкова М.А. Клінічна онкогематологія / М. А. Волкова. – М.: Медицина, 2007. - С. 28-29.
7. Ersek A. Daisy Adel. In vivo generation of B-cell-like cells from CD34+ cells differentiated from human embryonic stem cells/ A. Daisy Adel Ersek, Nicole M. Varain // Experimental Hematology. – 2010. – Vol. 38. – P. 516 – 525.
8. Blyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow / A. Blyum // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1968. – Vol. 21 (suppl. 97). – P. 77-89.
9. Strauer B. E. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow transplantation in humans / B. E. Strauer, M. Brehm, T. Zeus // Circulation. – 2002. – Vol. 106. – P. 1913-1918.
10. “HLA typing” in Manual of Clinical Immunology / D. B. Amos, P. Pool, R. Rose [et al]. – American Society for Microbiology, 1976. – P. 797-804.
11. “Methods for enumerating lymphocyte populations” in Manual of Clinical Immunology / R. J. Winchester, G. Ross, N. R. Rose [et al.] – American Society for Microbiology, 1976. – P. 64-76.
12. A rapid method for preparation of pure lymphocyte suspensions. / E. Thorsby, A. Bratlie, P.I. Terasaki [et al.] // Histocompatibility Testing – 1970. - P.665 – 666.
13. Blyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. (Paper IV) / A. Blyum // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1968. – Vol. 21, Suppl 97. – P.77–89.
14. Blyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages / A. Blyum // Scand. J. Immunol. – 1976. - Vol. 5, Suppl, 5. - P. 9–15.
15. Almeida A. P. Gel formation with leucocytes and heparin / A. P. Almeida, M. A. Beaven // Life Sci. – 1980. – Vol. 26. – P. 549–555.
16. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies / N. T. Holland, M. T. Smith, B. Eskenazi, M. Bastaki // Mutation Research. – 2003. – Vol. 543. – P. 217-234.
17. Collection and storage of Human Blood Cells for mRNA Expression Profiling: A 15-Month Stability Study / J. Marteau, S. Mohr, M. le Pfister, S. Visvikis-Siest // Clinical Chemistry. – 2005. - Vol. 51. – P. 1250-1252.
18. Kaplan J. Altered lymphocyte markers and blastogenic responses associated with 24 hour delay in processing of blood samples. / J. Kaplan, D. Nolan, A. J. Ree // Immunol. Methods. - 1982. – Vol. 50 – P. 187–191.
19. Куртова А.В. Методы банкирования пуповинной крови / А. В. Куртова, Е. Е. Зуева, Л. М. Фрегатова – Санкт-Петербургский Государственный Медицинский Университет им. акад. И.П. Павлова. – Санкт – Петербург, Россия. Том 6. Иммунология. Сентябрь 2005. – 236 с.
20. Пат. 62182 Україна, МПК (2011.01) : А61К 35/14. Спосіб виділення стовбурових клітин для застосування їх у клінічній практиці / Карпенко Ю.І., Козлов В. П., Козлов Ю. В. ; заявник і патентовласник Одеської національний медичний університет. – № U2011 05126 ; заявл. 22.04.2011 ; опубл. 10.08.11, Бюл. № 15, 2011. – 3 с.

Надійшла 13.09.2012 р.
Рецензент: проф. С.М.Смірнов