

Dialysis against a recycled albumin solution enables the removal of albumin-bound toxins. *Artif Organs* 1993;17:809–13.

43. Хасабов Н.Н. Гусейнова Л.А., Анашкин В.А. и др. Острый токсический гепатит с тяжелым холестатическим синдромом, обусловленный приемом анаболических стероидных гормонов, успешно леченный альбуминовым диализом (MARS). *Нефрол и диализ* 2003;5(1):82–5.

44. Ямпольский А.Ф. Молекулярная адсорбционно-рециркулирующая система (МАРС) — новый метод лечения печеночной недостаточности. Первый собственный опыт. *Нефрол и диализ* 2003;5(1):15–20.

45. Evenepoel P, Laleman W, Wilmer A. et al. Prometheus versus molecular adsorbents recirculating system: comparison of efficiency in two different liver detoxification devices. *Artif Organs* 2006;30:276–84.

46. Awad S.S., Rich P.B., Kolla S. et al. Characteristics of an albumin dialysate

hemodiafiltration system for the clearance of unconjugated bilirubin. *ASAIO J* 1997;43:745–9.

47. Evenepoel P, Laleman W, Wilmer A. et al. Detoxifying capacity and kinetics of Prometheus- a new extracorporeal system for the treatment of liver failure. *Blood Purif* 2005;23:349–58.

48. Awad S.S., Rich P., Kolla S. et al. Can the clearance of phenylalanine be enhanced using an albumin dialysate hemodiafiltration system? *Surg Forum* 1997;48:151–3.

49. Looock J., Peters E., Stange J. et al. Change of human serum amino acid patterns (Fischer index) during a new dialysis treatment for liver failure (MARS). *Int J Artif Organs* 1997;20:500A.

50. Senf R., Klinge R., Kurz S. et al. Bilirubin-adsorption in 23 critically ill patients with liver failure. *Int J Artif Organs* 2004;27(4):717–22.

51. Laleman W, Wilmer A., Evenepoel P. et al. Effect of the molecular adsorbent recirculation system and Prometheus devices on

systemic haemodynamics and vasoactive agents in patients with acute-on-chronic alcoholic liver failure. *Crit Care* 2006;(10):108.

52. Catalina M.V., Barrio J., Anaya F. et al. Hepatic and systemic haemodynamic changes after MARS in patients with acute on chronic liver failure. *Liver Int* 2003;23(3):39–43.

53. Sen S., Mookerjee R.P., Cheshire L.M. et al. Albumin dialysis reduces portal pressure acutely in patients with severe alcoholic hepatitis. *Hepatology* 2005;43(1):142–8.

54. Mitzner S., Stange J., Klammt S. et al. Improvement of hepatorenal syndrome with extracorporeal albumin dialysis MARS: results of a prospective, randomized clinical trial. *Liver Transpl* 2000;6(3):277–86.

55. Kramer L., Gendo A., Funk G. et al. Clinical experience with artificial liver support in chronic liver failure with encephalopathy. *ASAIO J* 1997;46(2):211.

## Количественная и качественная оценка стволовых клеток кадаверного костного мозга

В.Б. Хватов, Н.В. Боровкова, Е.Г. Колокольчикова, О.И. Конюшко, Н.А. Колтовой, И.Н. Пономарев, М.Г. Минина, А.С. Перцев, М.Ш. Хубутия

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

### Quantitative and qualitative assessment of cadaver bone marrow stem cells

V.B. Khvatov, N.V. Borovkova, E.G. Kolokolchikova, O.I. Konyushko, N.A. Koltovoy, I.N. Ponomarev, M.G. Minina, A.S. Pertsev, M.Sh. Khubutia  
N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Care, Moscow

*Stem cell transplantation is a major tool of modern regenerative medicine. Stem cells can be obtained from the bone marrow (BM) of dead subjects.*

**Objective:** to provide a morphofunctional characterization of the cells obtained from the bone marrow of dead donor tissues by aspiration methods.

**Materials and methods.** BM samples were taken from 17 adult cadaver subjects, who had suddenly died from myocardial infarction or pulmonary artery embolism, not later than 6 hours after sudden death. BM was simultaneously taken (from the iliac bones on different sides) in 10 donors by aspiration and aspiration-washing methods within an hour. In 7 donors, BM sampling was made by the aspiration method (for 30 min) and then by the aspiration-washing (Valeri Borisovich khvatov khvatov@yandex.ru) method (for the following 30 min).

**Results.** The count of CD45<sup>low</sup>CD34<sup>+</sup>-cells obtained by the aspiration and aspiration-washing methods for taking BM differs insignificantly. The morphological pattern of the BM taken from live donors and cadavers is similar. When the aspiration and aspiration-washing methods are concurrently used, the total yield of viable hematopoietic stem cells averaged  $99.8 \pm 25.0 \times 10^6$  cells.

**Conclusion.** BM sampling from donor tissues in the first 6 hours of death yields viable, functionally active hematopoietic stem cells. Both the aspiration method and the aspiration-washing one may be used to sample BM from dead donor tissues. The successive use of aspiration and aspiration-washing is most efficacious. This combination of the methods enables one to obtain a BM suspension containing the therapeutic dose of hematopoietic stem cells.

**Key words:** donor tissues, hematopoietic stem cells, bone marrow, morphological study, immunological study.

**Введение**

В трансфузионной медицине можно выделить несколько взаимосвязанных научно-практических направлений: компонентная гемотерапия, экстракорпоральная гемокоррекция, аутогемотрансфузионное пособие, «количественная» трансфузиология и клеточные технологии [1–3]. При этом ведущую роль в хирургической практике отводят трансплантационной составляющей — пересадке тканей и клеток [4–6], исключительно перспективной для репаративной медицины. Значимость пересадки тканей и клеток для восстановления и воссоздания у человека искусственных органов взамен больных или утраченных определена Приказом Министра здравоохранения Российской Федерации № 325 от 25.07.2003 г. «О развитии клеточных технологий в Российской Федерации». Клетки являются универсальным стабильным модулем для любых клеточных реконструкций, что позволяет создать устойчивые ростки новой здоровой ткани в больных органах. Клеточная трансплантология предполагает введение клеток в больной организм для его лечения. Она может проводиться для замещения нефункционирующей или дефектной ткани или клеточной популяции, для стимуляции собственных стволовых клеток организма и усиления репаративной регенерации и даже для адресной доставки лекарственных средств, генетических конструкций и биомолекул. Трансплантация клеток служит основным инструментом современной регенеративной медицины и включает следующие последовательные этапы: выделение клеток из ткани, их очистку, фракционирование, культивирование, ген-модификацию и т. п., введение в организм реципиента.

В гематологии эффективно используют трансплантацию костного мозга (КМ). В последние годы клетки-предшественники все чаще применяют в терапии различных заболеваний в травматологии, сосудистой хирургии, иммунологии и других областях медицины [7–9]. КМ получают у добровольцев путем аспирации из крыла подвздошной кости или грудины под общим обезболиванием.

Другим источником стволовых клеток служит пуповинная кровь. Однако доза заготавливаемых клеток, как при заборе КМ у живого донора, так и при использовании пуповины, ограничена. Большой объем стволовых клеток можно получить из кадаверного КМ [10].

В настоящее время разработан ряд методов получения КМ от умерших доноров тканей и органов, основанных на двух различных принципах: сепарации из фрагментированных костей, предварительно извлеченных из тела донора, или аспирации КМ из кости без ее извлечения. Недостатки методов, в основе которых лежит предварительная фрагментация кости, — это трудоемкость и значительная продолжительность процедуры, травматизация клеток КМ, контакт полученного костного мозга с окружающей средой. Недостатки аспирационных методов получения КМ связаны с отсутствием у умерших доноров давления в кро-

веносном русле и необходимостью создания большого разрежения в аспирационной системе для адекватной аспирации КМ.

**Целью** настоящего исследования явилась морфофункциональная характеристика клеток, получаемых из КМ умерших доноров тканей аспирационными методами.

**Материал и методы**

Исследование проведено с включением материала от 17 доноров тканей на базе отделения консервирования тканей НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского. Причиной внезапной остановки сердца были инфаркт миокарда (7 случаев) и тромбоэмболия легочной артерии (10 случаев). Возраст умерших варьировал от 46 до 65 лет. Забор КМ осуществлялся не позднее 6 ч от момента внезапной смерти. Заготовка КМ проводилась одновременно, из симметричных участков крыльев подвздошных костей с одной стороны аспирационным, с другой — аспирационно-вымывным методом [11, 12]. Простая аспирация проводилась через 1 или 2 троакара. Для аспирации с вымыванием использовали 2 троакара: по одному вводился перфузирующий раствор, по второму проводилась аспирация. Для перфузии использовали раствор NaCl 0,9% с добавлением гепарина (1000 МЕ на 450 мл раствора) либо раствор Рингера. Для адекватной аспирации КМ в системе для сбора КМ создавалось рабочее разрежение 0,6–0,7 атмосфер. Длительность процедуры составляла в среднем 60 мин.

В течение  $4,0 \pm 0,3$  ч от момента заготовки полученный биоматериал обследовался. Концентрацию лейкоцитов в образце КМ определяли на гематологическом анализаторе. Содержание стволовых гемопоэтических клеток оценивали с помощью моноклональных антител CD45 и CD34 на проточном цитометре. Для оценки жизнеспособности клеток применяли ДНК-специфический краситель 7-(амино)-актиномицин D (7AAD). Морфологическое исследование клеток КМ проводили в мазках, окрашенных азур-эозином по Романовскому.

Из полученного КМ магнитной сепарацией (с помощью набора Dynal CD34 progenitor cell selection system) выделяли гемопоэтические стволовые клетки. Выделенную фракцию гемопоэтических стволовых клеток помещали в пластиковые флаконы (Nunc, Дания) и площадью ростовой поверхности 25 см<sup>2</sup>. Для культивирова-

Таблица 1. Сравнительная характеристика взвеси КМ, полученной аспирационным и аспирационно-вымывным методом

Показатель	Метод	
	аспирация, $X \pm m$	аспирация с вымыванием, $X \pm m$
Объем КМ взвеси, мл	137,5±38,3	270,0±49,8*
Концентрация лейкоцитов, $\times 10^9$ /л	36,1±6,4	20,8±4,4
Общее количество лейкоцитов в КМ-взвеси, $\times 10^9$ клеток	3,5±0,7	4,1±0,7
Содержание CD45 <sup>low</sup> CD34 <sup>+</sup> -клеток, %	0,69±0,10	0,76±0,08
Общее количество полученных CD45 <sup>low</sup> CD34 <sup>+</sup> -клеток, $\times 10^6$ клеток	26,0±6,7	32,2±6,9

\* $p < 0,05$ .

Таблица 2. *Количественная характеристика взвеси КМ, полученной комбинацией методов*

Показатель	Метод		
	аспирация, X±m	аспирация с вымыванием, X±m	комбинация методов, X±m
Объем взвеси КМ, мл	389,3±119,1	390,0±82,3	779,3±196,7
Концентрация лейкоцитов, × 10 <sup>9</sup> /л	34,9±4,7	20,0±3,3	25,1±2,2
Общее количество лейкоцитов, × 10 <sup>9</sup> клеток	12,4±3,9	6,1±1,0	18,5±4,7
Содержание CD45 <sup>low</sup> CD34 <sup>+</sup> -клеток, %	0,6±0,1	0,6±0,1	0,6±0,1
Общее количество полученных CD45 <sup>low</sup> CD34 <sup>+</sup> клеток, × 10 <sup>6</sup> клеток	65,5±22,4	34,3±7,0	99,8±25,0

ния клеток использовали среду ДМЕМ рН 7,2 (производство ГУ ИПВЭ им. М.П. Чумакова РАМН) с добавлением 20% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота («БиолоТ», Россия). Смену среды проводили ежедневно.

Статистическую обработку результатов проводили на ЭВМ с помощью программы SPSS методами описательной статистики и Т-теста для сравнения независимых выборок.

**Результаты и обсуждение**

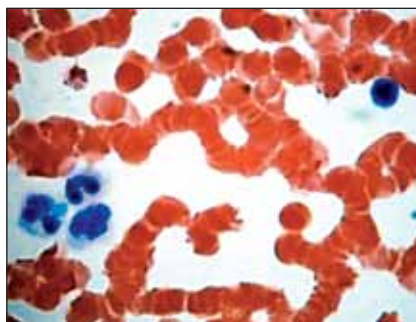
Результаты исследования образцов КМ, полученных аспирационным и аспирационно-вымывным методами, отражены в табл. 1. Несмотря на то что объем взвеси КМ, получаемой при аспирационно-вымывном методе, вдвое превышает объем взвеси КМ, получаемой при аспирации, общее количество CD45<sup>low</sup>CD34<sup>+</sup>-клеток различается незначительно. В 2 случаях объем взвеси КМ, полученный аспирационным методом в течение 60 мин, составил менее 25 мл при концентрации клеток до 78,0 × 10<sup>9</sup>/л, что, возможно, было связано с внутрисосудистым свертыванием крови.

Установлено, что большую часть объема взвеси КМ при классической аспирации получали за первые 30 мин, в остальное время поступление аспирата по каналам было незначительным. В связи с этим проведены 7 экспериментов, в которых в течение 30 мин проводилась классическая аспирация из крыльев подвздошной кости

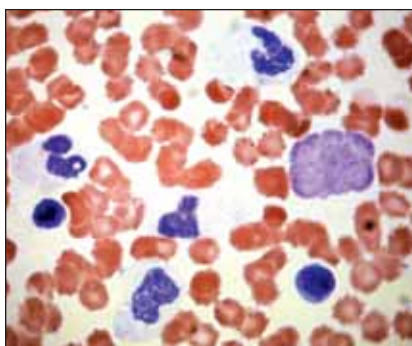
с обеих сторон через 4 троакара. Далее она переводилась на аспирацию с вымыванием путем выключения одного из каналов из аспирации и подведением через него перфузионного раствора. В табл. 2 представлены результаты забора КМ, полученные при комбинации классической аспирации из 2 троакаров (30 мин) с последующей аспирацией с вымыванием (30 мин). Общий выход жизнеспособных гемопоэтических стволовых клеток при использовании комбинации классического аспирационного метода с аспирационно-вымывным составил в среднем 99,8±25,0 × 10<sup>6</sup> клеток и был сопоставим с терапевтической дозой, применяемой при клеточной терапии у гематологических больных (1—2 × 10<sup>6</sup>/кг).

Среднее содержание жизнеспособных клеток во взвеси КМ, полученной классическим аспирационным методом, составило 88,2±4,0%, а аспирационно-вымывным — 72,4±7,3%.

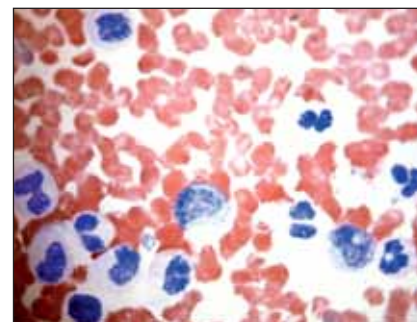
При цитологическом исследовании КМ в мазках, окрашенных азур-эозином по Романовскому, наблюдали большое количество эритроцитов, преимущественно нормального строения. Небольшую часть эритроцитов составляли эхиноциты (рис. 1). На рис. 2, 3 представлены клетки эритроидного, миелоидного, моноцитарного, мегакариоцитарного рядов на разных стадиях развития. Большая часть клеток имела нормальную структуру, что свидетельствовало о сохранении костным мозгом жизнеспособности. Последнее положение подтверждено исследо-



**Рис. 1.** Клетки костного мозга. Препарат окрашен азур-эозином по Романовскому. В поле зрения — много эритроцитов, единичные клетки гранулоцитарного ряда и лимфоцит



**Рис. 2.** Мегакариоциты и эритробласты на разных стадиях развития. Мегакариоцит, от цитоплазмы которого отщипуровываются пластинки — тромбоциты, имеет очень крупные размеры, ядро в виде больших сегментов и обширную светлую цитоплазму



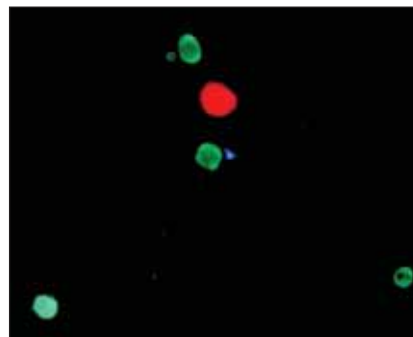
**Рис. 3.** Проллиферативная активность клеток кадаверного КМ. Клетки КМ находятся в состоянии митотической активности. Справа — клетка в телофазе митоза

ванием жизнеспособности клеток с использованием витального красителя 7AAD (рис. 4).

Функциональную активность гемопоэтических стволовых клеток полученного КМ исследовали в культуре клеток, наблюдая в течение 5 нед. За это время клетки остались жизнеспособными. При микроскопии в культуре отмечалось деление клеток. При этом наблюдали как одиночные клетки, так и группы из 2—4 клеток, а также цепочки из 5—6 клеток округлой формы с крупными ядрами. Добавление в среду интерлейкина-1 $\beta$  в концентрации 10 мкг/мл приводило к усилению пролиферативной активности клеток, и по мере увеличения срока культивирования на ростовой поверхности увеличивалось количество небольших групп сцепленных клеток. При изменении графика смены среды происходило накопление детрита, который был равномерно распределен между клетками и не мешал их делению.

#### Выводы

Заготовка КМ от доноров тканей в первые 6 ч от момента смерти позволяет получить клеточную взвесь с жизнеспособными, функционально активными стволовыми гемопоэтическими клетками. Морфологическая картина получаемой КМ-взвеси сравнима с КМ живых доноров. Для заготовки КМ от умершего донора тканей можно использовать как классический аспирационный, так и аспирационно-вымывной методы. Наиболее эффективно последовательное использование аспирации и аспирации с вымыванием. Такая комбинация методов позволяет получить КМ-взвесь с содержанием терапевтической дозы гемопоэтических стволовых клеток (до  $99,8 \pm 25,0$  млн клеток).



**Рис. 4.** Препарат КМ, флуоресцентная микротография. Окраска клеток моноклональными антителами CD45 (меченные FITC, зеленая окраска) и CD34 (меченные фикоэритрином, синяя окраска), витальный краситель 7AAD (красная окраска). Большое количество жизнеспособных клеток (красный цвет) и незначительное число погибших. Зеленым цветом (CD45) окрашены лейкоциты. Стволовые гемопоэтические клетки окрашены в зеленый и синий цвет одновременно

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Жибурт Е.Б. Стволовые клетки в службе крови. Трансфузиология 2003;2(4):63—75.
2. Трансфузиологическая гемокоррекция: учебное пособие для врачей. Под ред. А.А. Рагимова. М.: Практическая медицина, 2008.
3. Хватов В.Б. Клиническая трансфузиология при неотложных состояниях (современные концепции и перспективы). НИИ СП им. Н.В. Склифосовского. М., 2003.
4. Берсенева А.В. Клеточная трансплантология — история, современное состояние и перспективы. Клеточн трансплантол и тканей инженерия 2005;1:49—56.
5. Деев Р.В., Берсенева А.В. Роль стволовых стромальных (мезенхимальных) стволовых клеток в формировании гетеротопических оссификатов. Клеточная трансплантол и тканей инженерия 2005;1:46—8.
6. Рабинович С.С., Селедцов В.И., Астраков С.В. и др. Клеточная терапия в системе реанимации больных с тяжелой черепно-мозговой травмой. Вестн интенс тер 2004;4:24—7.
7. Хватов В.Б., Ваза А.Ю., Жиркова Е.А., Бочарова В.С. Заместительная клеточная терапия. Трансплантология 2009;(1): 31—3.
8. Шумаков В.И., Онищенко Н.А., Крашенинников М.Е. и др. Костный мозг как источник получения мезенхимальных клеток для восстановительной терапии поврежденных органов. Вестн трансплантол и искусств органов 2002;4:3—6.
9. O'Reilly R.J. Allogenic bone marrow transplantation: current status and future directions. Blood 1983;62:941—64.
10. Blazar B.R., Lasky L.C., Perentesis J.P. et al. Successful donor cell engraftment in a recipient of bone marrow from a cadaveric donor. Blood 1986;67(6):1655—60.
11. Kushida T., Inaba M., Ikebukuro K. et al. A New Method for Bone Marrow Cell Harvesting. Stem Cells 2000;18(6): 453—6.
12. Kushida T., Inaba M., Ikebukuro K. et al. Comparison of bone marrow cells harvested from various bones of cynomolgus monkeys at various ages by perfusion or aspiration methods: a preclinical study for human BMT. Stem Cells 2002;20(2):155—62.