# Доклиническое исследование отечественного препарата стволовых клеток пуповинной крови «Криоцел»

*К.Г. Сурков, Л.А. Белова, В.К. Красняков*
*Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ (ВНЦ БАВ)*
*Санкт-Петербургское ГУЗ «Городская станция переливания крови»*

**Ключевые слова:** стволовые клетки, пуповинная кровь, Криоцел.

*В статье представлены результаты изучения влияния отечественного препарата Криоцел на течение ишемического инсульта и острого инфаркта миокарда в эксперименте.*

### Введение

В течение последних десятилетий проблема поиска новых средств и способов коррекции как самих острых нарушений кровообращения сердца и мозга, так и последствий этих нарушений, приобретает все большую значимость в связи с высоким уровнем летальности, значительной инвалидизацией и социальной дезадаптацией пациентов. Так, во всем мире инвалидами в результате инсульта являются около 30 млн человек. Другим примером последствий острой ишемии высокоспециализированных тканей является снижение сократительной способности сердечной мышцы, закономерно развивающейся после острого инфаркта миокарда, как следствие процессов ремоделирования. Основанием для проведения данной работы послужили накапливающиеся данные о возможности терапии различных ишемических состояний высокоспециализированных тканей и последствий таких состояний с помощью стволовых клеток пуповинной/плацентарной крови человека. Количество попыток воздействия на состояния, вызванные дефицитом кровоснабжения с помощью стволовых клеток периферической крови и костного мозга крови в клинике растет. Показано, что инфузия аутогенных стволовых клеток костного мозга в ходе баллонной ангиопластики приводит к уменьшению зоны инфаркта у больных [1]. В экспериментах на животных показано, что костномозговые клетки [2], стволовые клетки периферической крови животных [3] способны в модельных экспериментах на животных нивелировать неврологический дефицит, обусловленный ишемией головного мозга. Хотя имеются работы, показывающие значительную эффективность препаратов клеток пуповинной крови человека на различных моделях ишемии, неясно, надолго ли сохраняется такой эффект, неизвестна его динамика и влияние таких препаратов на отдаленные последствия ишемии.

Целью данной работы явилось изучение способности отечественного препарата Криоцел, (концентрата стволовых клеток пуповинной/плацентарной крови человека) производства Санкт-Петербургского ГУЗ «Городская станция переливания крови»:

- влиять на динамику неврологических нарушений как в близкие, так и в отдаленные периоды после острого нарушения мозгового кровообращения, вызванного окклюзией срединной мозговой артерии;
- влиять на развитие сердечной недостаточности, закономерно развивающейся после инфаркта миокарда, вызванного перевязкой левой коронарной артерии.

### Материалы и методы

Препарат стволовых клеток пуповинной/плацентарной крови человека Криоцел производится в соответствии с «Инструкцией по выделению и хранению концентрата стволовых клеток пуповинной/плацентарной крови человека», утвержденной Минздравом РФ в 2003 году. Препарат представляет собой взвесь мононуклеаров пуповинной/плацентарной крови человека, помещенную в криоконсервирующий раствор и замороженную в программируемом режиме до температуры жидкого азота. Следовательно, вводимые клетки являлись ксеногенными по отношению к животному-реципиенту. Криомешок с препаратом непосредственно перед введением препарата вынимали из жидкого азота, где он находился, спустя 2–3 минуты помещали в водяную баню с температурой +37° С и оттаивали, осторожно раздавливая тающие кристаллы льда. Сразу после того, как кристаллы льда исчезали, криопакет извлекали из водяной бани.

Перед использованием препарата клетки отмывали от криоконсервирующего раствора, содержащего диметилсульфоксид и ресуспендировали клетки 10% раствором реополиглюкина. Методом витальной окраски трипановым синим определяли процент жизнеспособных клеток в камере Горяева. Препарат перед введением разводили до нужной концентрации 0,9%-ным стерильным раствором хлорида натрия.

Эксперименты по моделированию ишемического инсульта проводили на белых крысах-самцах массой 370–400 г линии Вистар. Ишемию воспроизводили путем постоянной окклюзии левой средней мозговой артерии (ПОСМА) под общей анестезией хлоралгидратом в соответствии с рекомендациями по доклиническому изучению новых фармакологических веществ [4], причем окклюзия достигалась путем электрокоагуляции без разрушения скулового отростка. При имитации операции (ложная ПОСМА) электрокоагуляция не производилась.

Моделирование острого инфаркта миокарда (ОИМ) осуществлялось перманентной окклюзией нисходящей ветви левой коронарной артерии (ОЛКА) на границе средней и нижней трети у крыс-самцов массой 230–250 г линии Вистар, находящихся на самостоятельном дыхании. При имитации окклюзии лигатура под артерию не подводилась и, соответственно, не перевязывалась. В следующий этап эксперимента включались животные, у которых выявлялся широкий зубец Q (более 0,3 мВ), а также ложнооперированные животные, выжившие в течение 24 часов после операции.

Объем введения препарата каждому животному составлял 2,0 мл. Препарат Криоцел вводился однократно внутривенно со скоростью около 4 мл в час в двух дозах: $2\times10^4$ или $2\times10^6$ клеток. Препарат (или растворитель, соответственно) вводился либо через 24 часа после окклюзии, либо через несколько дней после нее: в случае экспериментов

на модели ОИМ – через 5 дней, в случае экспериментов на модели ишемического инсульта – через 7 дней.

У животных с экспериментальным инсультом (или ложной операцией) нарушения координации выявляли в тесте «вращающийся стержень». Для этого регистрировали время удерживания животных на барабане, вращающемся со скоростью 18 об/мин. За 2 дня до тестирования животных предварительно тренировали по 5 мин при скорости вращения барабана 9 об/мин. За 1 день перед операцией животные трижды проходили тест, среднее время этих тестов (в секундах) регистрировалось как первоначальное для данного животного. Индивидуальное время каждого животного, зарегистрированного в этом же тесте после операции, определяли как долю от первоначального значения (до операции) для данного животного. Вращательную асимметрию исследовали на ротометре в «апо-тесте». Для этого апоморфин вводили в дозе 0,5 мг/кг внутрибрюшинно за 30 мин до теста. Регистрировали разницу между количеством оборотов влево и количеством оборотов вправо, совершенных животным в течение 30 минут. Неврологический дефицит оценивался по шкале Menzies [5]. Когнитивные расстройства оценивались в тесте на выработку условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) в соответствии с рекомендациями по доклиническому изучению новых фармакологических веществ [4]. Животное помещали на платформу, установленную в центре камеры с электрифицированным полом. Обучение крыс производили путем электроболевого раздражения путем подачи тока силой 0,3 мА на решетку пола. Животное переходило на безопасную платформу и должно было оставаться на ней в течение 10 минут. Воспроизведение рефлекса оценивалось через 24 часа после обучения, путем помещения животного на безопасную платформу. Фиксировали латентное время схода животного с платформы на пол камеры. Оценка по вышеуказанным тестам проводилась на 2-й и 10-й неделе после операции.

У крыс с экспериментальным ОИМ (или ложной операцией) через 45 дней после вмешательства проводили оценку интолерантности к физическим нагрузкам в тесте «принудительного плавания» с грузом. Фиксировалось время до начала погружения крысы. Для оценки степени компенсаторной гипертрофии миокарда определялось соотношение массы сердца к массе тела животного. Для этого через 2 дня после проведения теста «принудительного плавания» животные взвешивались и подвергались эвтаназии методом декапитации. Непосредственно после эвтаназии сердце извлекалось из грудной клетки и взвешивалось.

### *Результаты и обсуждение*

Результаты экспериментов представлены на рис. 1–6. Как видно из представленных данных, препарат при экспериментальном инсульте вызывал значительное ускорение восстановления нарушенных функций. К 10-й неделе животные, получившие препарат, практически не отличались от ложнооперированных животных. К концу исследования различия между группами ложнооперированных животных и животных, получивших препарат, выявлялись только в нагрузочном тесте на вращательную асимметрию («апо-тест») (рис. 3).

В экспериментах на модели ОИМ препарат в значительной степени уменьшал развитие гипертрофии миокарда (рис. 5). При анализе влияния препарата на предотвращение развития интолерантности к физической нагрузке выявлены те же закономерности (рис. 6).

При этом введение препарата Криоцел в обеих модельных системах в большей дозе и/или в более ранние сроки от момента возникновения ишемии приводило к более выраженному эффекту. Каких-либо негативных эффектов, связанных с введением препарата, не отмечалось.

Как показано в работах зарубежных исследователей, приживление введенных стволовых клеток пуповинной крови в организме реципиента не является обязательным для получения терапевтического эффекта [6]. Так, введение препарата человеческих стволовых клеток пуповинной крови животным (крысам) с перевязанной левой средней мозговой артерией приводило к уменьшению зоны некроза и ускоренному восстановлению неврологических функций, по сравнению с контрольной группой [7, 8, 9]. На модели острого ишемического инсульта у мышей показано, что введение CD 34$^+$ клеток пуповинной крови человека может усиливать ангиогенез, нейрогенез, морфологическое и функциональное восстановление мозга [10]. Экспериментальные исследования эффективности стволовых клеток на модели инфаркта миокарда у животных показали опреде-

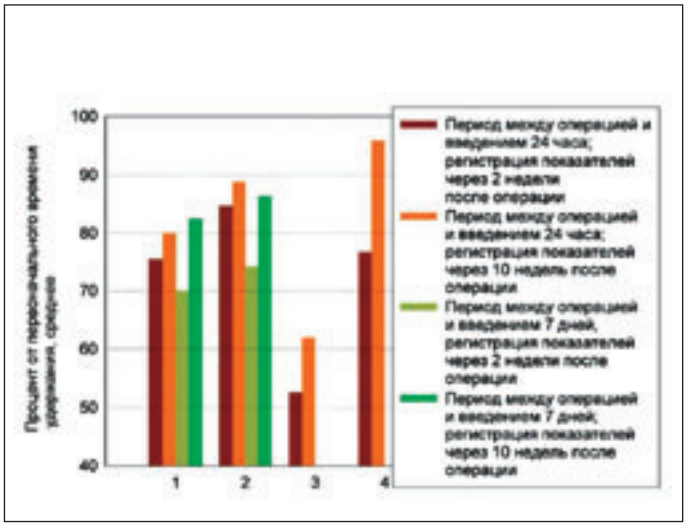


*Рис. 1. Влияние препарата на восстановление координации в тесте «вращающийся стержень»*
*Группы: 1 – ПОСМА + препарат 2×10$^4$ кл.; 2 – ПОСМА + препарат 2×10$^6$ кл.; 3 – ПОСМА + растворитель; 4 – ложная операция + растворитель*

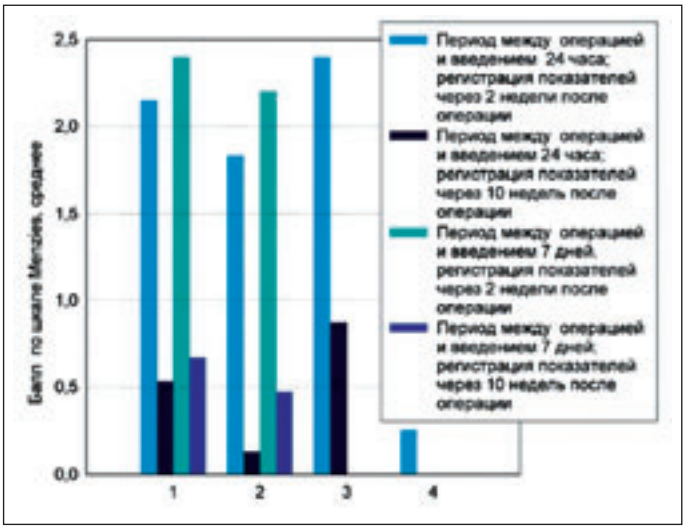


*Рис. 2. Влияние препарата на редукцию неврологического дефицита*
*Группы: 1 – ПОСМА + препарат 2×10$^4$ кл.; 2 – ПОСМА + препарат 2×10$^6$ кл.; 3 – ПОСМА + растворитель; 4 – ложная операция + растворитель*

ленную эффективность данного метода [11, 12]. Также улучшение кровоснабжения и/или восстановление функции при воздействии препарата стволовых клеток пуповинной крови человека было получено в эксперименте для ишемизированных конечностей животных [13, 14].

### *Заключение*

В настоящей работе впервые показана эффективность препарата клеток пуповинной крови человека (отечественный препарат Криоцел) в отношении снижения выраженности как ранних, так и отдаленных последствий ишемического поражения сердца и мозга. При этом препарат показал свою эффективность при его применении, как в ранние, так и в поздние сроки от момента возникновения ишемии. На модели острого инфаркта миокарда показано снижение выраженности компенсаторной постинфарктной гипертрофии миокарда и недостаточности кровообращения, закономерно возникающих в процессе постинфарктных изменений сердечной мышцы. При лечении экспериментального ишемического инсульта продемонстрировано более полное и ускоренное восстановление нервных функций, включая когнитивные и координационные расстройства. В клинике препарат может представлять собой эффективное средство профилактики и/или лечения последствий инфаркта миокарда и инсульта, для чего необходимы соответствующие клинические испытания.

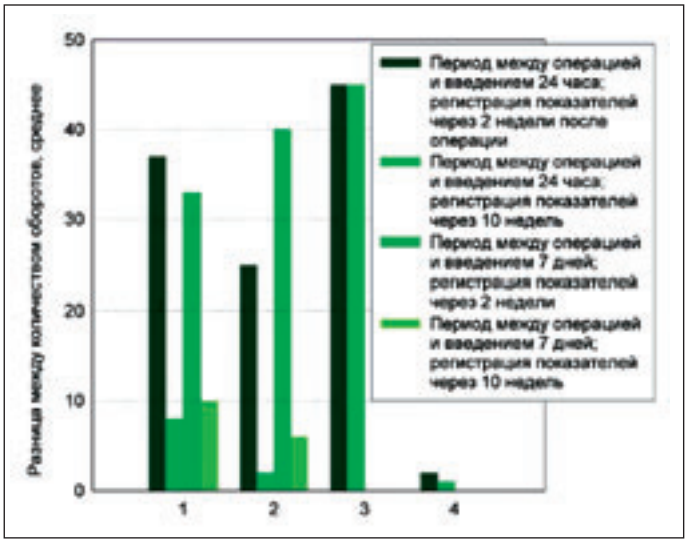


*Рис. 3. Влияние препарата на редукцию двигательной ассиметрии в «апо–тесте»*
*Группы: 1 – ПОСМА + препарат 2×10⁴ кл.; 2 – ПОСМА + препарат 2×10⁶ кл.; 3 – ПОСМА + растворитель; 4 – ложная операция + растворитель*

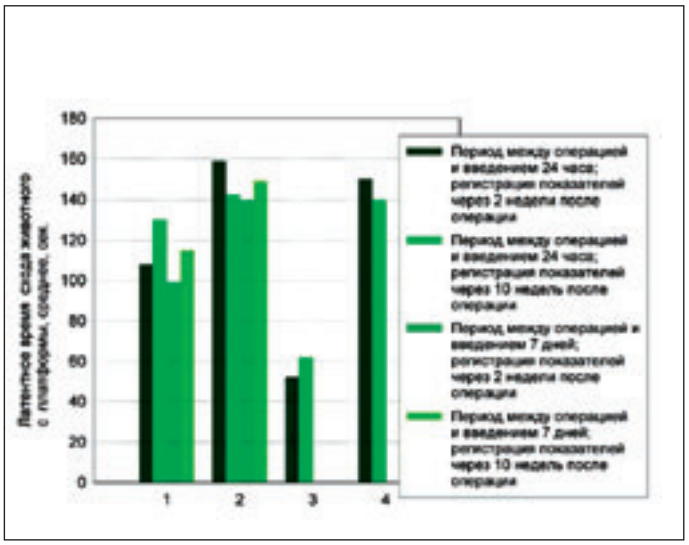


*Рис. 4. Влияние препарата на динамику восстановления когнитивных функций в тесте УРПИ*
*Группы: 1 – ПОСМА + препарат 2×10⁴ кл.; 2 – ПОСМА + препарат 2×10⁶ кл.; 3 – ПОСМА + растворитель; 4 – ложная операция + растворитель*

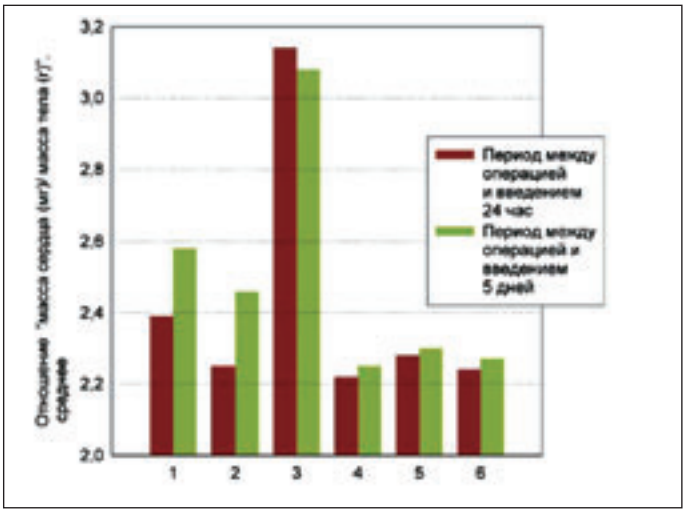


*Рис. 5. Влияние препарата на постинфарктную гипертрофию миокарда*
*Группы: 1 – ОЛКА + препарат 2×10⁴ кл.; 2 – ОЛКА + препарат 2×10⁶ кл.; 3 – ОЛКА + растворитель; 4 – ложная операция + препарат 2×10⁴ кл.; 5 – ложная операция + препарат 2×10⁶ кл.; 6 – ложная операция + растворитель*

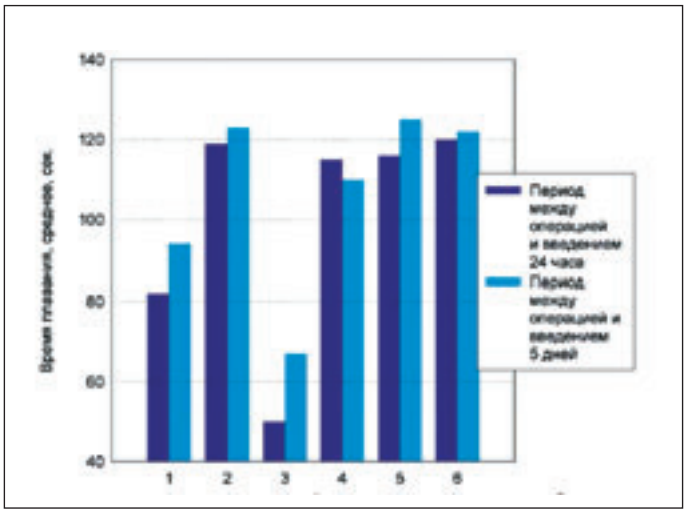


*Рис. 6. Влияние препарата на интолерантность к физической нагрузке в тесте «принудительное плавание»*
*Группы: 1 – ОЛКА + препарат 2×10⁴ кл.; 2 – ОЛКА + препарат 2×10⁶ кл.; 3 – ОЛКА + растворитель; 4 – ложная операция + препарат 2×10⁴ кл.; 5 – ложная операция + препарат 2×10⁶ кл.; 6 – ложная операция + растворитель*

ЛИТЕРАТУРА:

1. Strauer B.E., Brehm M., Zeus T. et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. Circulation 2002; 106(15): 1913–8.
2. Chen J., Li Y., Katakowski M. et al. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. J. Neurosci. Res. 2003; 73(6): 778–86.
3. Willing A.E., Vendrame M., Mallery J. et al. Mobilized peripheral blood cells administered intravenously produce functional recovery in stroke. Cell Transplant. 2003; 12(4): 449–54.
4. Арзамасцев Е.В. и др. Методические указания по экспериментальному изучению препаратов для лечения нарушений мозгового кровообращений. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М., 2000: 159–61.
5. Menzies S.A., Hoff J.T., Betz A.L. Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model. Neurosurgery 1992; 31(1): 100–6.
6. Borlongan C.V., Hadman M., Sanberg C.D., Sanberg P.R. Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. Stroke 2004; 35(10): 2385–9.
7. Chen J., Sanberg P.R., Li Y. et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. Stroke 2001; 32(11): 2682–8.
8. Vendrame M., Cassady J., Newcomb J. et al. Infusion of human umbilical cord blood cells in a rat model of stroke dose–dependently rescues behavioral deficits and reduces infarct volume. Stroke 2004; 35(10): 2390–5.
9. Willing A.E., Lixian J., Milliken M. et al. Intravenous versus intrastriatal cord blood administration in a rodent model of stroke. J. Neurosci. Res. 2003; 73(1): 296–307.
10 .Taguchi A. et al. Administration of CD 34$^+$ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. J. Clin. Invest. 2004; 114: 330–8.
11. Henning R.J. et al. Human umbilical cord blood mononuclear cells for the treatment of acute myocardial infarction. Cell Transplant. 2004; 13: 729–39.
12. Hirata Y. et al. Human umbilical cord blood cells improve cardiac function after myocardial infarction. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005; 327: 609–14.
13. Yang C. et al. [Transplantation of cord blood endothelial progenitor cells ameliorates limbischemia] Zhonghua Yi Xue Za Zhi 2003; 83: 1437–41 [Article in Chinese].
14. Madeddu P. et al. Transplantation of low dose CD34$^+$KDR$^+$ cells promotes vascular and muscular regeneration in ischemic limbs. FASEB J 2004;18: 1737

**ООО «КэмБио»** - официальный дистрибьютор компании **StemCell Technology Inc.** на территории РФ представляет:

**Robosep™** – систему для автоматического выделения стволовых клеток на основе **EasySep®** технологии:

- Прибор позволяет использовать позитивный и негативный метод выделения клеток
- Одновременное выделение клеток из 4 разных образцов.
- Максимальное количество клеток в каждом образце $2\times10^9$ клеток.
- Выделение проводятся без использования колонок.
- Прибор позволяет выделять клетки (CD3$^+$, CD4$^+$, CD8$^+$, CD14$^+$, CD15$^+$, CD19$^+$, CD33$^+$, CD34$^+$, CD56$^+$, CD66b$^+$, CD33$^+$ & CD66B$^+$) из цельной крови.
- Используются FACS–совместимые магнитные наночастицы
- Протоколы выделения могут быть оптимизированы под эксперименты пользователя

**RosetteSep®**–система для выделения стволовых клеток из цельной крови.

Специализированные среды для культивирования гемопоэтических клеток:

**MethoCult®**– среды на основе метилцеллюлозы,
**MegaCult®**–среды на основе коллагена,
**MyeloCult®**–среды для длительного культивирования
Мезенхимальных (MesenCult®) клеток,
Нервных (NeuroCult®) клеток,
Цитокины (BMP-4, EGF, EPO, FGF-b, G-CSF, GM-CSF, IGF-1 ,IL-2, M-CSF, OSM, PRL и др.)
Антитела (CD2, CD3, CD4, CD11b, CD90, CD45, CD38 CD34, HLA-G и др.)

**StemSpan® SFEM , StemSpan® H3000** – специализированные среды не содержащие сыворотки
Сыворотки (**FBS**) для гемопоэтических, мезенхимальных клеток

**Специализированные атласы** (Colony Atlas, Human Hematopoetic Colony Slides, Basic Cell Culture Protocols, Human Hematopoetic Colonies in Health and Disease)

Тел.: (495) 223–92–79, (495) 223–92–89 www.chembio.ru