

УДК 615.275.4, 615.324, 615.072, 57.085.23, 576.08

©Коллектив авторов

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ СЕКРЕТОРНЫХ КОМПОНЕНТОВ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА: ПРОБЛЕМА СТАНДАРТИЗАЦИИ

Г.Д. Сагарадзе^{1,3}, О.А. Григорьева³, А.Ю. Ефименко^{1,2}, А.А. Чапленко³,
С.Н. Суслина^{1,4}, В.Ю. Сысоева¹, Н.И. Калинина¹, Ж.А. Акопян^{1,2}, В.А. Ткачук^{1,2}*

¹Факультет фундаментальной медицины Московского государственного
университета имени М.В. Ломоносова,
119192, Москва, Ломоносовский пр., 31/5; тел.: 8(495)9328814;
эл. почта: efimenkoan@gmail.com

²Медицинский научно-образовательный центр Московского государственного
университета имени М.В. Ломоносова, Москва

³ООО “Генная и клеточная терапия”, Москва

⁴Медицинский факультет Российского университета дружбы народов, Москва

В настоящее время активно разрабатываются подходы регенеративной медицины, направленные как на создание замещающих поврежденные ткани конструкций *ex vivo*, так и на стимуляцию эндогенных процессов репарации и регенерации при различных заболеваниях. Одним из основных инструментов регенеративной медицины являются стволовые и прогениторные клетки, к которым относятся мультипотентные мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК). Поскольку основным механизмом регенераторных эффектов МСК считается паракринное действие биологически активных факторов, секретируемых этими клетками, применение экстрацеллюлярных продуктов секреции МСК для стимуляции регенерации тканей является перспективным подходом и обладает рядом преимуществ по сравнению с введением самих клеток. Однако, учитывая сложность как состава, так и механизма действия препаратов на основе продуктов секреции МСК, отличающие их от большинства фармацевтических средств, актуальной проблемой является разработка подходов к их стандартизации и контролю качества.

В данной работе на основании анализа литературы, нормативной документации и собственных экспериментальных данных были обоснованы номенклатура и методики контроля качества экстрацеллюлярного комплекса продуктов секреции МСК жировой ткани человека по ключевым показателям “Подлинность”, “Специфическая активность” и “Биологическая безопасность”. Апробация разработанных подходов была проведена на образцах кондиционированной среды, содержащей продукты секреции МСК, выделенных из подкожной жировой ткани 30 доноров. Разработанная и апробированная нами стратегия стандартизации для инновационных лекарственных средств и биоматериалов на основе биологически активного комплекса продуктов секреции МСК человека может быть применена к широкому кругу биоактивных продуктов сложного состава, полученных с использованием различных типов стволовых и прогениторных клеток.

Ключевые слова: регенеративная медицина, продукты секреции стволовых/прогениторных клеток, мезенхимные стволовые/стромальные клетки жировой ткани, стандартизация, контроль качества

DOI: 10.18097/PBMC20156106750

ВВЕДЕНИЕ

При многих заболеваниях зачастую происходит необратимая утрата части тканей или органов, и проблема их восстановления не может быть решена с помощью традиционных подходов клинической медицины и фармацевтики. Это обусловило

возникновение и развитие новой области медицины – регенеративной медицины, направленной на стимуляцию полноценного структурного и функционального восстановления тканей и органов после повреждения. Одним из основных инструментов регенеративной медицины являются стволовые и прогениторные клетки, к которым относятся

* - адресат для переписки

мультипотентные мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК). Регенераторный потенциал МСК обеспечивается множеством биологических эффектов этих клеток [1–3]. Ключевым механизмом действия МСК по современным представлениям является их способность секретировать биологически активные молекулы, в частности, различные факторы роста и цитокины, играющие важнейшую роль в регуляции процессов регенерации и репарации в организме [3–5]. Благодаря этому, МСК демонстрируют регенеративные свойства даже при низком уровне приживления *in vivo* после введения в организм [6].

Легкодоступным и удобным источником МСК является жировая ткань. Согласно результатам многочисленных исследований, кондиционированная среда от МСК жировой ткани (МСК-ЖТ) обладает значительным регенераторным потенциалом, стимулирует восстановление кровоснабжения и иннервации тканей после повреждения, способствует ускоренному заживлению кожных повреждений [1–3, 7, 8]. Кондиционированная среда, содержащая продукты секреции МСК-ЖТ человека, способствует активации эндогенных процессов репарации за счёт дополнительного привлечения стволовых и прогениторных клеток в область повреждения [5, 9].

Использование бесклеточных продуктов на основе биологически активных факторов, секретированных стволовыми и прогениторными клетками, в терапии позволяет значительно снизить риски, связанные с введением собственно клеток [10]. Кроме того, использование МСК в качестве материала для клеточной терапии в настоящее время в России существенно затруднено из-за отсутствия законодательной базы, регламентирующей использование клеточных технологий в клинической практике. Таким образом, секретированные МСК биоактивные продукты являются перспективными для регенеративной медицины, и разработка лекарственных средств (ЛС) и биоматериалов на основе биологически активного комплекса экстрацеллюлярных продуктов секреции МСК является целесообразной.

Данные ЛС можно охарактеризовать как биофармацевтические, стратегия разработки, производства и контроля качества которых описана в нормативных документах и научной литературе. При обосновании номенклатуры показателей качества и создании методик стандартизации биологически активного комплекса экстрацеллюлярных продуктов секреции МСК человека можно заимствовать логику подходов к контролю качества биофармацевтических ЛС и ЛС для регенеративной медицины. Однако она не всегда применима к ЛС на основе продуктов секреции МСК человека из-за сложности их состава и множественности биологических эффектов. Таким образом, актуальной является проблема разработки подходов к контролю качества таких продуктов, позволяющая проводить их стандартизацию, а также оптимизировать технологию производства ЛС и биоматериалов на их основе.

МЕТОДИКА

Характеристика пациентов, включённых в исследование

В исследование были включены 30 пациентов, среди которых было 16 мужчин и 14 женщин. Средний возраст доноров составил $52,8 \pm 14,6$ года, индекс массы тела – $23,4 \pm 2,3$ кг/м². Критериями включения являлись возраст старше 18 лет, отсутствие хронических заболеваний, готовность дать информированное согласие на взятие биопсии жировой ткани. Критериями исключения считали: возраст старше 70 лет, наличие аутоиммунных патологий; наличие злокачественных новообразований, в том числе в анамнезе; наличие острых или хронических воспалительных заболеваний; сахарный диабет; наличие у пациента острых/хронических вирусных и бактериальных инфекций; длительную гормональную или антибиотикотерапию. В исследование также не включали беременных и пациентов с поливалентной аллергией. Образцы подкожной жировой ткани забирали у пациентов по время операций на брюшной полости, при ревизии почки и мочевого пузыря. Все пациенты подписывали добровольное информированное согласие на взятие у них образцов жировой ткани и использование их для научных целей.

Выделение МСК из жировой ткани

Выделение клеток из полученного в результате операции материала осуществляли в стерильных условиях ламинарного бокса. Ткань измельчали сосудистыми ножницами до консистенции суспензии мелких (размером не более 2 мм³) кусочков и смешивали с растворами ферментов коллагеназы I типа (200 ед/мл, “Worthington Biochemical”, США) и диспазы (40 ед/мл, “Sigma”, Германия) при соотношении объёма ткани (в мл) к объёму ферментативного раствора (в мл) 1:2. Образец инкубировали при 37°C в течение 30–45 мин при постоянном встряхивании. По окончании инкубации добавляли равный объём среды роста МСК и центрифугировали при 200 g в течение 8 мин. Белёсый поверхностный слой, состоящий из зрелых адипоцитов и кусочков ферментативно необработанной ткани, удаляли с помощью вакуумного насоса, а осадок, состоящий из клеток стромы жировой ткани и клеток сосудистой стенки и крови, суспендировали в стерильной деионизованной воде для лизирования эритроцитов. Чтобы восстановить осмотическое давление, добавляли соответствующий объём 10-кратного фосфатного буфера, а затем фильтровали через нейлоновые фильтры с размером пор 100 мкм (“BD Falcon Cell Strainer”, США) и центрифугировали при 200 g 5 мин. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в среде, поддерживающей рост недифференцированных мезенхимных прогениторных клеток (Advance Stem Cell Basal Medium, далее – AdvanceSM, “HyClone”, США), содержащей 10% смеси факторов роста (Advance Stem Cell Growth Supplement, “HyClone”), 100 Ед/мл пенициллина/стрептомицина (“HyClone”).

Выделенные клетки высаживали на чашки Петри (“Corning”, США) в концентрации $5 \times 10^4/\text{см}^2$ и инкубировали в CO_2 -инкубаторе (5% CO_2 ; 95% воздуха) при 37°C. На следующий день в чашках меняли среду для удаления не прикрепившихся клеток. Смену среды проводили каждые 2-3 дня; при достижении 70-80% конfluence клетки рассаживали в соотношении 1:3 с использованием раствора QTase (HyClone). Жизнеспособность клеток оценивали путём окраски клеток раствором трипанового синего и подсчета количества живых и мертвых клеток с помощью счётчика клеток (Cell Counter, “Invitrogen”, США).

Получение кондиционированной среды от МСК-ЖТ

Для получения кондиционированной среды МСК-ЖТ 4-5 пассажа, достигшие 80% конfluence, промывали трёхкратно раствором Хэнкса (“ПанЭко”, Россия). К чашкам добавляли среду AdvanceSM, DMEM с низким содержанием глюкозы (далее – DMEM-LG, “HyClone”) или среду, разработанную для поддержания роста МСК, NutriStem XF Medium (“Biological Industries”, Израиль) (далее – NutriStem), содержащих 100 Ед/мл пенициллина/стрептомицина (“HyClone”). Клетки культивировали в течение 7 дней, после чего кондиционированную среду собирали, очищали от клеточного дебриса путём центрифугирования в течение 10 мин при 300 g, замораживали в жидком азоте и хранили в аликвотах при температуре -70°C для последующих экспериментов.

Оценка содержания факторов роста в образцах кондиционированной среды методом иммуноферментного анализа (ИФА)

Содержание фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), фактора роста гепатоцитов (HGF), основного фактора роста фибробластов (FGF2), ангиопоэтина-1 (Angpt-1) и фактора роста, полученного из клеток пигментного эпителия (PEDF), в образцах кондиционированной среды от МСК-ЖТ определяли с помощью соответствующих коммерческих наборов для ИФА (R&D Systems для VEGF, HGF, FGF2, Angpt-1 и Cusabio для PEDF), согласно протоколу производителя.

Определение эндотоксинов

Содержание бактериальных эндотоксинов в образцах кондиционированной среды от МСК-ЖТ определяли с помощью теста с лизатом амёбоцитов *Limulus* (*Limulus amoebocyte lysate*, LAL-тест) (“Charles River Laboratories Inc.”, США) по стандартному протоколу. Исследуемые образцы разводили в 100 раз водой для LAL-теста (“Пиротест”, Россия) для предотвращения ингибирования реакции. Разведения стандартов и образцов испытывали в четырёх повторях, отрицательный контроль – в двух.

Определение лактатдегидрогеназы (ЛДГ)

Анализ содержания ЛДГ в исследуемых образцах проводили с помощью коммерческого набора

(“Диакон-ВНЦМДЛ”, Россия), согласно инструкции к набору, методом спектрофотометрии. Изменение абсорбции в минуту рассчитывали по прямолинейному участку кинетической кривой.

Оценка стерильности образцов

Проводили оценку стерильности образцов кондиционированной среды от МСК-ЖТ, приготовленных как с добавлением, так и без добавления антибиотика на этапе кондиционирования. Для этого исследуемые образцы разливали на стерильные культуральные чашки диаметром 60 мм (“Corning”) по 2 мл на чашку и инкубировали в CO_2 -инкубаторе (5% CO_2 ; 95% воздуха) при 37°C. Через 2, 5 и 14 суток оценивали микроскопически наличие бактериальной и грибковой контаминации образцов (микроскоп Leica DM4000, объектив 40x).

Определение контаминации образцов микоплазмой

Анализ контаминации образцов кондиционированной среды от МСК-ЖТ микоплазмой проводили с помощью коммерческого индикаторного теста Plasmotest (“Invivogen”, США), согласно протоколу производителя.

Измерение скорости миграции фибробластов человека на модели клеточной раны с помощью прижизненной микроскопии

Культуру клеток человеческих фибробластов кожи высевали на 24-луночные планшеты Cellstar (“GreinerBio-One”, США) в среде DMEM-LG (“HyClone”), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (“HyClone”) и 1% раствор пенициллина/стрептомицина (“HyClone”), и выращивали до конfluence. Затем клетки депривировали в среде DMEM-LG без сыворотки в течение 24 ч. Клеточный монослой соскребали наконечником ёмкостью 1 мл непосредственно перед сменой депривационной среды на испытуемые образцы кондиционированной среды от МСК-ЖТ. В качестве положительного контроля использовали DMEM с 10% FBS, отрицательного – DMEM без сыворотки. Планшеты помещали на рабочую поверхность автоматического инвертированного микроскопа NikonTi (“Nikon”, Япония), снабжённого 5x объективом, термостатируемой ячейкой для планшетов (37°C) и системой непрерывной подачи газовой смеси, обогащённой углекислым газом до 5% и нагретой до 37°C. Поля зрения для съёмки выбирали с помощью панели “MarkandFind” приложения NISElements (“Nikon”). В каждой лунке случайным образом выбирали 2 области рядом с “раной” для отслеживания миграции клеток. Изображения получали каждые 15 мин в течение 24 ч с помощью камеры Nikon DSU3 (“Nikon”). На полученных сериях изображений с помощью программного обеспечения ImageJ отслеживали траектории миграции случайно выбранных клеток (50 на поле зрения) и рассчитывали их среднюю скорость в мкм/час.

Оценка скорости миграции клеток EA.hy926 в системе xCELLigence

Для оценки направленной миграции использовали CIM-plate (16-луночные планшеты) для прибора xCELLigence (“Roche”, Швейцария), которые представляют собой автоматизированные камеры Бойдена, позволяющие наблюдать клеточную миграцию в режиме реального времени. Верхняя и нижняя камеры планшета разделены мембраной с диаметром пор 8 мкм. В нижнюю камеру помещали исследуемые образцы кондиционированной среды от МСК-ЖТ (по 160 мкл). В качестве положительного контроля миграции в нижнюю камеру добавляли среду культивирования DMEM с 10% FBS, в качестве отрицательного – DMEM без сыворотки. Исследовали изменение скорости направленной миграции человеческих эндотелиальных клеток линии EA.hy926, предварительно депривированных в течение 6-8 часов, для этого в верхнюю камеру добавляли по 50 мкл суспензии клеток EA.hy926 до конечной концентрации 30×10^4 кл. в лунке. В нулевой момент времени снимали базовое значение показателя сопротивления электрода на нижней части мембраны, которое изменялось по мере того, как мигрирующие клетки из верхней камеры перемещались на нижнюю сторону мембраны и распластывались на ней. Рассчитывали клеточный индекс (cell index, CI) и скорость миграции как отношение изменения CI за заданный промежуток времени к величине этого промежутка в единицах CI/час. Значения CI регистрировали автоматически в течение последующих 4 ч с интервалом 15 мин. Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения RTCA Software (“Roche”).

Статистический анализ

Для статистических расчетов использовали ПО “Statistica 10”. Для сравнения двух независимых групп использовали критерий Манна-Уитни, для анализа данных в нескольких независимых группах – критерий Краскела-Уоллиса с последующим применением критерия Данна для установления различий между конкретными группами. Корреляционный анализ проводили с использованием метода Спирмена. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обоснование выбора методов оценки качества экстрацеллюлярных продуктов секреции МСК-ЖТ человека

Для контроля качества биологических ЛС выбирают критерии, оценивающие пригодность ЛС к применению в терапевтических целях. Как и для всех других ЛС, в первую очередь, даётся характеристика физико-химических свойств ЛС, которая обычно включает в себя состав, физические свойства и первичную структуру действующего вещества. Однако, самыми критичными для контроля

качества биологических ЛС являются группы показателей “Биобезопасность”, “Подлинность” и “Специфическая активность”.

Биобезопасность

При контроле качества обязательен выбор методов, позволяющих оценить чистоту и биобезопасность биологического ЛС. В контексте МСК особенно важно контролировать содержание микоплазмы [11]. Микоплазма может обнаруживаться с помощью культуральных, индикаторных технологий, а также с помощью амплификации нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) [12]. Для контроля контаминации микоплазмой кондиционированной среды от МСК-ЖТ мы выбрали высокочувствительный и не требующий использования дополнительного оборудования индикаторный метод, основанный на использовании специальной линии клеток HEK-Blue2, которые при добавлении кондиционированной среды меняют спектрофотометрические характеристики своей среды в зависимости от наличия микоплазмы в исследуемых образцах.

Тесты на стерильность выявляют заражение образца микроорганизмами различной природы. Для оценки стерильности субстанции, содержащей продукты секреции эукариотических клеток, возможно использование как традиционных подходов, описанных в Государственной фармакопее XII [13] и связанных с применением жидкой тиогликолевой среды (или других сред, подходящих для роста тест-микроорганизмов, – например, *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes* и др.), так и инновационных подходов, основанных на применении более быстрого ПЦР-анализа. Бактериальную контаминацию клеточной культуры или продукта на основе кондиционированной среды от клеток, как правило, легко заметить невооруженным глазом по резкому увеличению мутности среды, изменению её цвета (при наличии pH-индикатора в составе). Макро- и микроскопическое наблюдение за отобранными образцами продукта при инкубации в условиях CO₂ инкубатора с поддержанием температуры 37°C позволяет детектировать контаминацию бактериями и микроскопическими грибами на ранней стадии. Данный способ контроля не является самым точным, но из-за легкости и простоты проведения может быть использован на этапе разработки технологии производства продукта или как этап предварительного бактериологического контроля для выбора образцов для дальнейшего контроля.

При проведении специфических тестов для выявления контаминации клеточного продукта бактериями, грибами или простейшими, возможно использование как традиционных, подробно описанных подходов, основанных на инокуляции образца препарата в микробиологическую среду с последующей инкубацией при 35-37°C до 14 дней [13]. Стандартные протоколы микробиологического контроля представлены в виде стандартов в фармакопее РФ (ГФ XII), стран Евросоюза (EP) и США (USP) [13, 14].

В связи со значительной длительностью и сложностью проведения микробиологических тестов, использующих питательные среды, в последние годы был предложен ряд экспресс-методов бактериологического контроля [15]. Подход, лежащий в основе данных методов, – оценка бактериологической загрязненности препарата путём амплификации бактериальной 16S рибосомальной ДНК (рДНК) с последующей ПЦР-детекцией. Бактериальная 16S рДНК включает в себя как высоковариабельные, так и относительно постоянные участки. Таким образом, ПЦР-анализ широкого спектра вариантов данного гена может определить наличие бактерий, а анализ последовательности амплифицированной ДНК позволяет установить название вида и даже штамма бактерии. В отдельных исследованиях [15] была показана применимость метода для идентификации *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus bovis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* в составе контаминированных клеточных препаратов. Данный метод позволяет значительно сократить время, необходимое для анализа (8-12 ч вместо нескольких дней или недель), а также достоверно установить вид микроорганизма.

Оценка биобезопасности биологических ЛС также должна включать оценку содержания эндотоксинов – продуктов нежелательных микроорганизмов. Контроль по этому показателю проводят с помощью LAL-теста. Простота выполнения и высокая чувствительность данного *in vitro* теста позволили стать ему основным методом определения эндотоксинов. Существует несколько модификаций LAL-теста: гель-тромб тест, хромогенный и турбидиметрические методы. Результаты гель-тромб теста визуализируются по образованию геля в тест-пробирках при реакции LAL-реагента с эндотоксином [16]. При хромогенном тесте используется синтетический пептид, который добавляется в исследуемый образец и при наличии в нём эндотоксина подвергается протеолиту с высвобождением пара-нитроанилина, поглощающего свет с длиной волны 405 нм. При турбидиметрическом тесте в присутствии эндотоксина протеолиз подвергается субстрат-компонент LAL-реагента; его частицы после протеолиза объединяются благодаря ионным взаимодействиям и делают испытуемый раствор мутным. Все три модификации разрешены к применению Фармакопеей США [17], а в России, согласно ГФ XII, предпочтение отдаётся гель-тромб тесту, но допускается использование других методов и/или модификаций LAL-теста, если они указаны в частной фармакопейной статье и валидированы для конкретного ЛС [13].

В ходе проведения LAL-теста могут возникать сложности. В частности, испытуемое ЛС может содержать мешающие факторы, усиливающие и/или ингибирующие реакцию LAL-реактива с бактериальными эндотоксинами [13]. Значения pH вне диапазона 6,0-7,5 также нарушают процессы гелеобразования [17]. Реакция LAL-теста – серия

ферментативных реакций с участием сериновых протеаз, функция которых нарушается при выходе из оптимума pH [18]. Для реакции гелеобразования необходимо присутствие двухвалентных катионов. Поэтому хелаторы таких катионов, например, ЭДТА, могут приводить к неправильным результатам гель-тромб реакции [17]. Также на конечный результат теста влияют денатурирующие белки вещества и субстанции, сорбирующие эндотоксин или меняющие вязкость испытуемого раствора [19]. В данном контексте гель-тромб тест имеет преимущество: в сравнении с другими модификациями LAL-теста он демонстрирует меньшее число ложноположительных и ложноотрицательных результатов при анализе субстанций [17]. При испытаниях биологических ЛС на реакции гелеобразования могут влиять и биологически активные молекулы природного происхождения. Например, трипсин стимулирует процесс гелеобразования, химотрипсин и некоторые другие протеазы вызывают лишь неполное гелеобразование. Ингибитор трипсина, наоборот, препятствует гелеобразованию. Тромбин и тромбопластин, активаторы системы коагуляции млекопитающих, и некоторые рибонуклеазы способны дать ложноположительные результаты. LAL-тест обычно обладает чувствительностью к меньшим, чем определяемые, концентрациям. Данное его свойство позволяет избежать вмешательства стимуляторов и/или ингибиторов в ход реакции гелеобразования путём разбавления образца [18]. В случае ненадлежащего значения pH его можно оптимизировать путем добавления NaOH, HCl или с помощью буферных растворов. Для избавления от белков с нежелательной активностью испытуемый образец подвергают тепловой обработке, при которой белки денатурируют. В частности, метод эффективен при наличии в образце трипсина. Однако следует учитывать усиление адсорбционной способности некоторых белков в отношении эндотоксина [18].

При выполнении LAL-теста для контроля содержания эндотоксинов в кондиционированной среде МСК-ЖТ были учтены ограничения методики. По некоторым данным, среди экстрацеллюлярных продуктов секреции МСК-ЖТ обнаруживаются ингибиторы биологического происхождения [20, 21]. Так, по данным анализа протеома кондиционированной среды, полученной с помощью МСК костного мозга человека, в секретируемых микровезикулах есть белок со стимулирующей активностью: трипсин-1 [20]. Ингибиторами реакции гелеобразования могут выступать полусинтетические пенициллины, используемые в процессе производства исследуемой субстанции. Для предупреждения влияния ингибиторов на реакцию гелеобразования исследуемые образцы разводили перед анализом.

При кондиционировании МСК-ЖТ длительное время культивируют в бессывороточных средах без добавления питательных добавок. Это требует включения в список показателей контроля качества параметра, отражающего жизнеспособность клеток

и выделение погибшими клетками нежелательных метаболитов в кондиционированную среду. Для этого целесообразно определение активности в кондиционированной среде фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ). ЛДГ можно обнаружить во многих типах клеток. Этот фермент локализуется в цитозоле и при повреждении клеточной мембраны высвобождается в культуральную среду. Активность фермента в среде можно оценить по реакции окисления NADH, добавленного к используемому образцу.

Подлинность

Сложность состава комплекса экстрацеллюлярных продуктов секреции МСК-ЖТ человека предполагает выбор для контроля по показателю “Подлинность” нескольких секретируемых факторов, которые могут рассматриваться в качестве основных действующих веществ. Ключевые факторы роста, опосредующие регенеративные эффекты МСК-ЖТ человека (VEGF, HGF, FGF2, Angpt-1), были выбраны на основании данных литературы [4] и наших собственных результатов, полученных ранее при исследовании вклада различных факторов в ангиогенную активность кондиционированной среды МСК-ЖТ [22, 23]. Следует отметить, что в секрете МСК-ЖТ, помимо факторов роста, оказывающих стимулирующее влияние на рост и формирование кровеносных сосудов, и тем самым способствующих успешной регенерации, присутствуют другие факторы, обладающие антиангиогенными эффектами [20, 23]. Важным показателем, влияющим на биологические эффекты комплекса продуктов секреции МСК-ЖТ человека, может оказаться баланс между факторами разнонаправленного действия. В связи с этим в анализ был включен PEDF, который в значительном количестве секретируется МСК-ЖТ человека и, согласно данным литературы, обладает антиангиогенным действием [24, 25].

Поскольку все указанные факторы являются белковыми макромолекулами, мы проводили контроль качества по показателю “Подлинность” с использованием метода ИФА, обладающего высокими чувствительностью, селективностью и относительной простотой выполнения.

Специфическая активность

Важнейшей задачей является оценка специфической биологической активности ЛС [26, 27]. Такие тесты проводятся на животных моделях, клеточных культурах или с помощью биохимических методов, и их выбор должен быть обусловлен предполагаемыми механизмами действия исследуемого ЛС. Терапевтический потенциал экстрацеллюлярного комплекса продуктов секреции МСК человека обеспечивается несколькими процессами: стимуляцией ангиогенеза, привлечением клеток в область повреждения, стимуляцией их пролиферации и миграции, повышением выживаемости, а также поддержанием функционального фенотипа клеток [7, 28].

Важнейшим типом клеток, участвующих в репарации и регенерации тканей после повреждения, являются фибробласты. Поэтому одной из моделей для оценки специфической активности экстрацеллюлярных продуктов секреции МСК-ЖТ была выбрана оценка миграции фибробластов кожи человека на модели клеточной раны.

Ангиогенез является необходимым процессом для успешной регенерации тканей. Способность вещества стимулировать ангиогенез *in vitro* может быть оценена по влиянию на пролиферацию и/или миграцию эндотелиальных клеток, а также по параметрам сформированных клетками эндотелия капилляроподобных трубочек на покрытии из белков внеклеточного матрикса, например, на Матригеле [7]. Миграция эндотелиальных клеток является ключевым процессом для ангиогенеза, поэтому для оценки специфической активности нами была выбрана также модель стимуляции направленной миграции эндотелиальных клеток человека по градиенту биоактивных факторов, содержащихся в кондиционированной среде МСК-ЖТ. Для этого использовали систему xCELLigence (“Roche”), позволяющую анализировать клеточную миграцию в режиме реального времени. Временные точки контроля скорости миграции были подобраны эмпирически.

Результаты биологических исследований должны быть представлены в единицах активности относительно национального или международного стандарта. Однако для новых ЛС часто такие стандарты отсутствуют, поэтому производитель должен иметь первичный стандарт, собственноручно изготовленный из образцов ЛС одной или нескольких партий. Мы подготовили первичный стандартный образец (ПСО) путём объединения равных объёмов всех готовых образцов кондиционированной среды МСК-ЖТ с последующим перемешиванием, разделением на аликвоты и немедленной их заморозкой при ультранизких температурах. С ПСО сравнивали полученный с новой произведённой партии рабочий стандартный образец (РСО), являющийся объединением трёх случайных образцов одной партии, взятых в одинаковых объёмах. Качество партии по показателю “Специфическая активность” считали удовлетворительным, если значение этого показателя для РСО было не ниже 90% и не более 125% от значения для ПСО. Данный диапазон был выбран на основании результатов оценки специфической активности отдельных образцов кондиционированной среды.

Апробация методик контроля качества на образцах кондиционированной среды, содержащей продукты секреции МСК-ЖТ человека

Апробация описанных выше методик контроля качества была проведена на образцах кондиционированной среды МСК-ЖТ, выделенных из жировой ткани 30 доноров и охарактеризованных на соответствие минимальным международным критериям, предъявляемым к МСК человека.

Для кондиционирования были использованы коммерческие бессывороточные среды роста для МСК человека, не содержащие ксеногенных добавок: AdvanceSM (“HyClone”), Nutristem (“Biological Industries”) и DMEM-LG (“HyClone”).

Для контроля качества образцов по группе показателей “Биобезопасность” была проведена оценка стерильности исследуемых образцов, в том числе при отсутствии антибиотиков, а также образцы были проанализированы на содержание микоплазмы и бактериальных эндотоксинов. Все испытуемые образцы оказались стерильными, ни в одном из образцов не было обнаружено контаминации микоплазмой, содержание эндотоксинов в образцах не превышало 5 ЕД/мл, и было показано, что в испытуемых разведениях образцы не являются ингибиторами реакции гелеобразования. Во всех исследуемых образцах наблюдали низкие значения ферментативной активности ЛДГ (от 0 до 19 Е/л) по сравнению с показателями сыворотки крови человека (85-180 Е/л), что в сочетании с удовлетворительными показателями жизнеспособности МСК-ЖТ, по данным окраски клеток трипановым синим (не менее 70% живых клеток во всех образцах), косвенно свидетельствует о низком уровне в образцах токсичных компонентов от погибших клеток. Таким образом, для всех образцов экстрацеллюлярных продуктов секреции МСК-ЖТ человека была подтверждена биологическая безопасность по выбранным показателям контроля качества.

При рекогносцировочных экспериментах образцы, приготовленные при кондиционировании одних и тех же клеток в разных базовых средах

(AdvanceSM, NutriStem и DMEM-LG), были оценены с точки зрения содержания в них ключевых факторов роста, опосредующих регенераторные эффекты МСК-ЖТ. Поскольку при использовании среды AdvanceSM уровень большинства факторов был значительно ниже, эту среду исключили из дальнейшего анализа.

Количество VEGF, секретированного МСК-ЖТ, было значимо больше при кондиционировании клеток в среде DMEM-LG (рисунок 1А). Напротив, содержание в кондиционированной среде HGF и Angpt-1 оказалось выше при использовании для кондиционирования среды NutriStem (рисунок 1В,D). Статистический анализ значений по показателю “Подлинность” для образцов кондиционированной среды МСК-ЖТ, полученных от разных доноров, позволил установить минимальные пороговые значения для каждого фактора, рассчитанные как 5% процентиля по общей выборке. Так, было установлено, что содержание VEGF в образцах должно быть не менее 200 пг/мл, HGF – 150 пг/мл, FGF2 – 0,29 пг/мл, Angpt-1 – 45 пг/мл, PEDF – 500 пг/мл.

С образцами, полученными при кондиционировании МСК-ЖТ в средах DMEM-LG и NutriStem, были проведены тесты для оценки специфической активности. Образцы, полученные при использовании DMEM-LG, продемонстрировали значимую специфическую активность. Показатели специфической активности образцов кондиционирования среды NutriStem не достигли статистической значимости различий с отрицательным контролем, хотя эффект стимуляции миграции фибробластов наблюдался на уровне тенденции ($p=0,08$). Результаты тестов

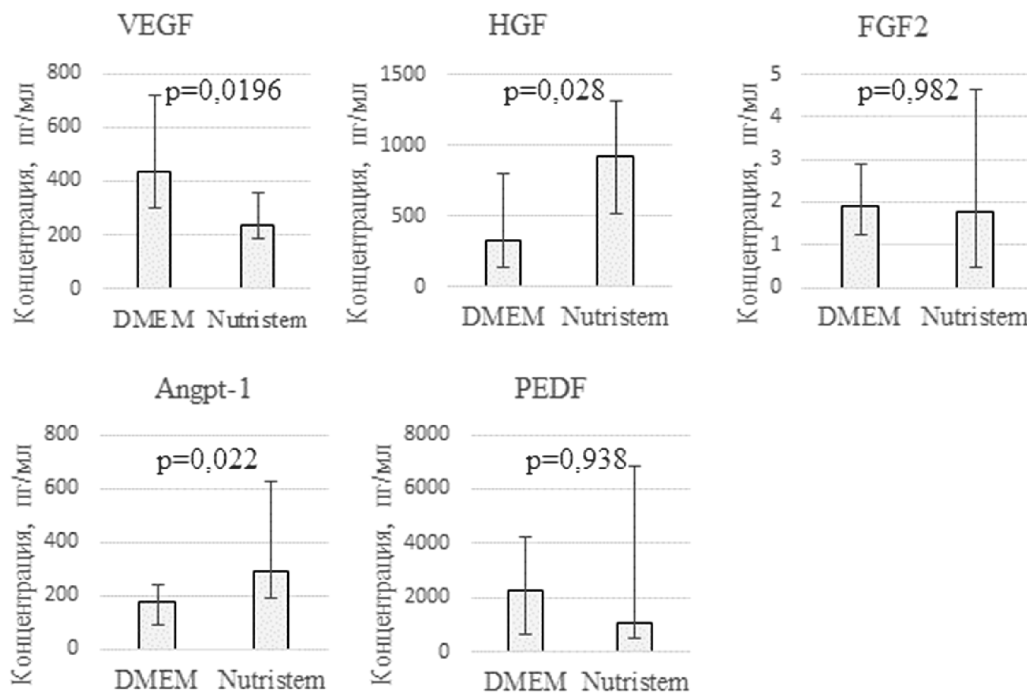


Рисунок 1. Сравнение содержания ключевых факторов роста в образцах кондиционированной среды от МСК-ЖТ, полученной на основе сред DMEM-LG и NutriStem. Данные представлены в виде медиана (25% и 75% процентиля). Над планками показан уровень значимости различий.

приведены на рисунке 2. Образцы кондиционированной среды, полученной при культивировании МСК-ЖТ человека в средах DMEM-LG и NutriStem, статистически значимо стимулировали миграцию эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926 (рисунок 3), демонстрируя свою специфическую активность на этой модели.

С целью проверки применимости разработанных стандартных образцов для контроля качества образцов кондиционированной среды, содержащей продукты секреции МСК-ЖТ человека, РСО партии были проанализированы по показателю “Специфическая активность” на модели миграции фибробластов. Данный показатель составил 12,04 мкм/ч для РСО, что укладывается в допустимый интервал по сравнению с ПСО (9,13 – 12,68).

Следует отметить, что оценка по показателю “Специфическая активность” с помощью тестов *in vitro* является ресурсоёмкой и сложной для валидации

процедурой. Поэтому мы оценили возможность замены этих методов на физико-химические методы (ИФА). Результаты ИФА и тестов *in vitro* были исследованы на предмет корреляционной связи между их результатами. Анализ данных показал, что наблюдается отрицательная корреляция между уровнем HGF ($r = -0,65$, $p = 0,022$) и тенденция к положительной корреляции между уровнем FGF-2 ($r = 0,46$, $p = 0,12$) в кондиционированной среде от МСК-ЖТ и скоростью миграции фибробластов кожи человека. Полученные данные подтверждаются литературными данными; так, показано, что HGF является фактором, ингибирующим активацию, в том числе и миграцию фибробластов [8]. При оценке миграции эндотелиальных клеток мы выявили статистически значимые положительные корреляционные связи между содержанием VEGF ($r = 0,84$; $p = 0,004$) и FGF2 ($r = 0,54$; $p = 0,03$), а также соотношением VEGF/PEDF ($r = 0,42$; $p = 0,04$) и относительной скоростью миграции EA.hy926.

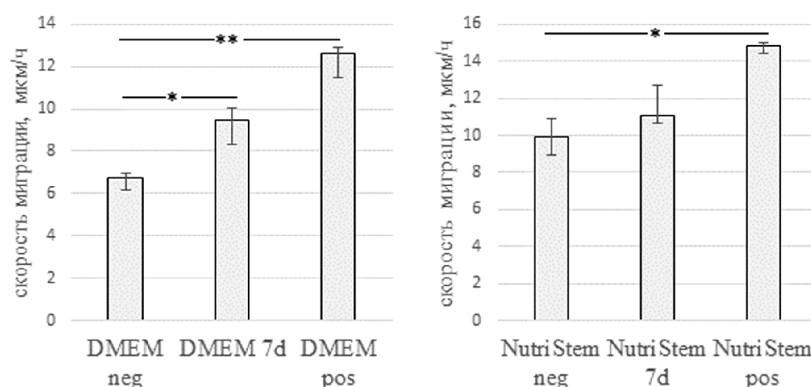


Рисунок 2. А. Скорость миграции фибробластов (модель клеточной раны) при стимуляции базовой средой DMEM-LG (отрицательный контроль; DMEM neg; $n=6$), образцами кондиционирования МСК-ЖТ человека в среде DMEM-LG (DMEM 7d), DMEM-LG + 10% FBS (положительный контроль; DMEM pos, $n=5$). **Б.** Скорость миграции фибробластов при стимуляции базовой средой NutriStem (отрицательный контроль; Nutri neg; $n=4$), образцами кондиционирования МСК-ЖТ человека в среде NutriStem (Nutri 7d), NutriStem с добавлением 10% добавки “NutriStem supplement” (положительный контроль; Nutri pos, $n=5$). Данные представлены в виде медиана (25% и 75% процентиля). * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$.

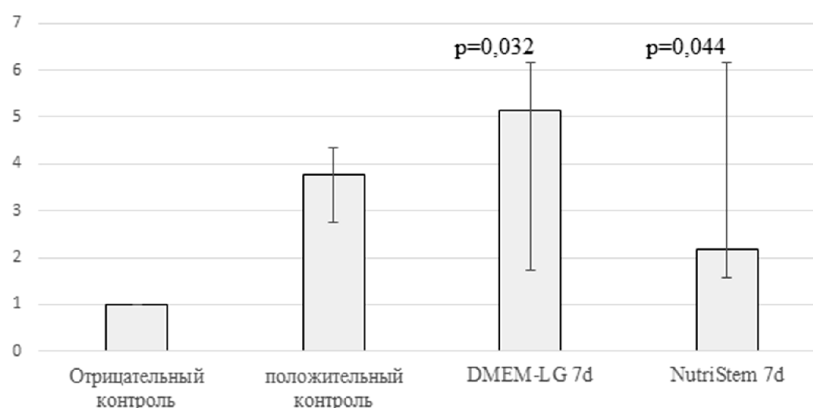


Рисунок 3. Оценка относительной скорости клеток EA.hy926 при стимуляции миграции образцами кондиционированной среды, полученной при культивировании МСК-ЖТ человека в средах DMEM-LG и NutriStem по сравнению с базовой средой DMEM-LG (отрицательный контроль, $n=4$) и DMEM-LG + 10% FBS (положительный контроль, $n=4$). Данные представлены как скорость миграции клеток относительно отрицательного контроля в виде медиана (25% и 75% процентиля). Показатели уровня значимости различий с отрицательным контролем указаны на графике.

Отношение содержания VEGF и PEDF, продуцированных МСК, может являться индикатором ангиогенной активности МСК [25]. Избыточный ангиогенный потенциал может сделать применение субстанции на основе продуктов секреции МСК-ЖТ небезопасным, а низкий – неэффективным. Для проверки баланса состава субстанции был проведен корреляционный анализ отношения концентраций VEGF и PEDF. Статистически значимая прямая корреляция концентраций этих факторов ($r=0,9$; $p=0,004$) косвенно подтверждает сбалансированность содержания про- и антиангиогенных факторов в исследованных образцах. Таким образом, существуют предпосылки для замены тестов *in vitro* для оценки специфической активности измерением отдельных факторов методом ИФА. Однако, относительно невысокие коэффициенты корреляции, а также недостаточный объем выборок на данном этапе работы не позволяет с высокой точностью предсказать специфическую активность комплекса экстрацеллюлярных продуктов секреции МСК-ЖТ человека по концентрациям ключевых факторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

На сегодняшний день бурное развитие получили подходы регенеративной медицины, направленные на использование регенераторных свойств стволовых и прогениторных клеток для лечения различных заболеваний. Одним из наиболее часто используемых типов клеток являются МСК, выделенные из костного мозга, жировой ткани или других источников. Значительное число данных свидетельствует, что МСК человека секретируют в культуральную среду многочисленные факторы роста и цитокины, которые играют первостепенную роль в процессах регенерации и репарации тканей и опосредуют терапевтический эффект этих клеток. На основании этих данных проводятся разработки нового типа лекарственных средств на основе кондиционированной среды, содержащей секретируемые компоненты МСК, обладающие способностью стимулировать регенерацию, как при применении отдельно, так и в комбинации с различными биосовместимыми носителями. Однако, для успешной трансляции таких продуктов в клинику необходимыми являются стандартизация и разработка методов контроля их качества, что может быть затруднено, учитывая комплексность состава и сложный механизм действия таких препаратов.

В нашей работе на основании анализа литературы, нормативной документации и собственных экспериментальных данных были обоснованы номенклатура и методики контроля качества экстрацеллюлярных продуктов секреции МСК-ЖТ человека по ключевым показателям “Подлинность”, “Специфическая активность” и “Биологическая безопасность”. В перечень показателей контроля качества были включены как общепринятые индикаторы качества биологических ЛС, так и новые, предложенные на основе

собственных экспериментальных данных, показатели. Разработанные подходы были апробированы на образцах кондиционированной среды, содержащей продукты секреции МСК, выделенных из жировой ткани нескольких десятков доноров, показана применимость выбранных методик, разработаны первичный и рабочий стандартный образцы и получены данные, необходимые для разработки нормативной документации и стандартизации ЛС на основе продуктов секреции МСК-ЖТ человека. Следует отметить, что актуальной остаётся задача подбора инструментальных методов контроля таких продуктов по показателю “Специфическая активность”, которые могли бы стать адекватной заменой более трудоемким и сложным для валидации тестам *in vitro*. Выбор конкретных моделей для контроля специфической активности исследуемого ЛС или биоматериала может меняться в зависимости от предполагаемой области применения. В целом, предложенная нами стратегия стандартизации для инновационных ЛС и биоматериалов на основе биологически активного экстрацеллюлярного комплекса продуктов секреции МСК человека может быть применена к широкому кругу биоактивных продуктов сложного состава, полученных с использованием различных типов стволовых и прогениторных клеток.

Работа выполнена на базе Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова и факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (Соглашение о субсидии № 14.607.21.0045 от 22 августа 2014 г., уникальный идентификатор прикладных научных исследований (проекта) RFMEFI60714X0045).

ЛИТЕРАТУРА

1. Калинина Н.И., Сысоева В.Ю., Рубина К.А., Парфенова Е.В., Ткачук В.А. (2011) *Acta Naturae* (русскоязычная версия), **3**(4), 32-39.
2. Парфенова Е.В., Ткачук В.А., Калинина Н.И., Траптуев Д.О., Ратнер Е.И., Талицкий К.А., Марч К.Л., Джонстон Б., Рахмат-Заде Т.М., Цоколаева З.И. (2006) *Молекулярная медицина*, №2, 10-23.
3. Caplan A.I., Correa D. (2012) *Cell Stem Cell*, **9**, 11-15.
4. Madrigal M., Rao K.S., Riordan N.H. (2014) *J. Transl. Med.*, **12**, 260.
5. Rubina K., Kalinina N., Efimenko A., Lopatina T., Melikhova V., Tsokolaeva Z., Sysoeva V., Tkachuk V., Parfyonova Y. (2009) *Tissue Eng. Part A*, **15**, 2039-2050.
6. Bollini S., Gentili C., Tasso R., Cancedda R. (2013) *J. Clin. Med.*, **2**(4), 302-327.
7. Efimenko A., Starostina E., Kalinina N., Stolzing A. (2011) *J. Transl. Med.*, **9**, 10-22.
8. Schievenbusch S., Strack I., Scheffler M., Wennhold K., Maurer J., Nischt R., Dienes H.P., Odenthal M. (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **385**, 55-61.
9. Li H., Fu X. (2012) *Cell Tissue Res.*, **348**, 371-377.
10. Herberts C.A., Kwa M.S.G., Hermesen H.P.H. (2011) *J. Transl. Med.*, **9**, 29.

11. EMA ICH Topic Q 5 D (1997) Quality of Biotechnological Products: Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products / EMA / Eur. Med. Agency.
12. European Pharmacopoeia 7.0. (2011) Mycoplasma 2.6.7 / European Pharmacopoeia 7.0. Council of Europe, Strasbourg.
13. Государственная фармакопея российской федерации (2008) Издательство "Научный центр экспертизы средств медицинского применения", – 704 с: ил. ISBN 978-5-9901447-1-2.
14. European Pharmacopoeia 7.0. (2011) Sterility 2.6.1 / European Pharmacopoeia 7.0. Council of Europe, Strasbourg.
15. Tokuno O., Hayakawa A., Yanai T., Mori T., Ohnuma K., Tani A., Minami H., Sugimoto T. (2015) Lab. Med., **46**, 34-41.
16. John A., Chowdhury A.K. (2010) J. Appl. Sci., **10**, 1930-1936.
17. Joiner T., Kraus P., Kupiec T. (2002) Int. J. Pharmaceut. Compound., **6**, 408-409.
18. Dawson M. (2005) LAL Update, **22**, 1-5.
19. Bacterial Endotoxins / Pyrogens (1985) FDA Inspection Technical Guides. Food and Drug Administration. - 1 с.
20. Kim H.-S., Choi D.-Y., Yun S.J., Choi S.-M., Kang J.W., Jung J.W., Hwang D., Kim K.P., Kim D.-W. (2012) J. Proteome Res., **11**, 839-849.
21. Kalinina N., Kharlampieva D., Loguinova M., Butenko I., Pobeguts O., Efimenko A., Ageeva L., Sharonov G., Ischenko D., Alekseev D. et al. (2015) Stem Cell Res. Ther., **6**, 1-12 (in press). Received 02 July 2015.
22. Ефименко А.Ю., Джояшвили Н.А., Старостина Е.Е., Калинина Н.И., Акчурин Р.С., Парфенова Е.В. (2012) в: Стволовые клетки и регенеративная медицина/ Под ред В.А Ткачука, Издательство "Макс-Пресс", Москва, 150-166.
23. Efimenko A., Dzhoyashvili N., Kalinina N., Kochegura T., Akchurin R., Tkachuk V., Parfenova Ye. (2014) Stem cells translational medicine, **3**, 32-41.
24. Matsui T., Nishino Y., Maeda S., Yamagishi S. (2012) Microvasc. Res., **84**, 105-108.
25. Fan W., Crawford R., Xiao Y. (2011) Differentiation, **81**(3), 181-191.
26. Миронов А.Н. (2012) Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К. – 944 с.
27. EMA ICH Topic Q 6 B. (1999) Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products / EMA / Eur. Med. Agency.
28. Zhao J., Hu L., Liu J., Gong N., Chen L. (2013) Biomed Res. Int., **2013**, 1-11. Received 26 July 2013.

Поступила: 24. 09. 2015.

THERAPEUTIC POTENTIAL OF HUMAN MESENCHYMAL STROMAL CELLS SECRETED COMPONENTS: A PROBLEM WITH STANDARTIZATION

G.D. Sagaradze^{1,3}, O.A. Grigorieva³, A.Yu. Efimenko^{1,2}, A.A. Chaplenko³, S.N. Suslina^{1,4}, V.Yu. Sysoeva¹, N.I. Kalinina¹, Zh.A. Akopyan^{1,2}, V.A. Tkachuk^{1,2}

¹Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University,

31/5 Lomonosovsky ave., Moscow, 119192 Russia; tel./fax: +7(495)9328814; e-mail: efimenkoan@gmail.com

²Medical Education and Research Center, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³OOO "Gene and Cell Therapy", Moscow, Russia

⁴Faculty of Medicine, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

Regenerative medicine approaches, such as replacement of damaged tissue by *ex vivo* manufactured constructions or stimulation of endogenous reparative and regenerative processes to treat different diseases, are actively developing. One of the major tools for regenerative medicine are stem and progenitor cells, including multipotent mesenchymal stem/stromal cells (MSC). Because the paracrine action of bioactive factors secreted by MSC is considered as a main mechanism underlying MSC regenerative effects, application of MSC extracellular secreted products could be a promising approach to stimulate tissue regeneration; it also has some advantages compared to the injection of the cells themselves. However, because of the complexity of composition and multiplicity of mechanisms of action distinguished the medicinal products based on bioactive factors secreted by human MSC from the most of pharmaceuticals, it is important to develop the approaches to their standardization and quality control.

In the current study, based on the literature data and guidelines as well as on our own experimental results, we provided rationalization for nomenclature and methods of quality control for the complex of extracellular products secreted by human adipose-derived MSC on key indicators, such as "Identification", "Specific activity" and "Biological safety". Developed approaches were tested on the samples of conditioned media contained products secreted by MSC isolated from subcutaneous adipose tissue of 30 donors. This strategy for the standardization of innovative medicinal products and biomaterials based on the bioactive extracellular factors secreted by human MSC could be applicable for a wide range of bioactive complex products, produced using the different types of stem and progenitor cells.

Key words: regenerative medicine, stem/progenitor cell secreted products, adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells, standardization, quality control