



ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР
ТРАНСФУЗИОЛОГИИ И МЕДИЦИНСКИХ БИОТЕХНОЛОГИЙ»
МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

**VII СЪЕЗД
ГЕМАТОЛОГОВ И
ТРАНСФУЗИОЛОГОВ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
«АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ
ГЕМАТОЛОГИИ И
ТРАНСФУЗИОЛОГИИ»**



**24-25 МАЯ 2012
МИНСК**

Федулов А.С.¹, Зафранская М.М.², Мотузова Я.М.¹, Нижегородова Д.Б.², Гузов С.А.¹, Багатка С.С.², Юркевич М.Ю.², Шпаковская М.А.¹

ЭФФЕКТИВНОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ И ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АУТОИММУННОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА

¹ГУО «Белорусский государственный медицинский университет», г.Минск, Республика Беларусь

²ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», г.Минск, Республика Беларусь

Актуальность. В последние годы показана перспективность использования при рассеянном склерозе (РС) трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (МСК), которая позволяет ремоделировать иммунную систему больных без применения высокодозной полихимиотерапии (ВПХТ). Другой альтернативой может явиться ВПХТ с последующей совместной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и МСК. Обоснованием этому служит тот факт, что в силу своих биологических свойств МСК поддерживают рост гемопоэтических клеток-предшественниц путём секреции кроветворных цитокинов (S. Beyth, 2005). Другими предпосылками, указывающими на целесообразность применения МСК в качестве ко-трансплантата при введении ГСК после ВПХТ при РС, являются способность МСК при прямом совместном культивировании с ГСК приводить к более выраженному иммуносупрессивному эффекту (G.M. Spaggiari, 2006) и дифференцировке ГСК в регуляторные дендритические клетки (M. Lukomska, 2001).

Тем не менее, в литературе отсутствуют данные об эффективности ко-трансплантации МСК и ГСК после ВПХТ, а также о сравнении эффективности и безопасности различных методик клеточной терапии РС. Изучение данного вопроса может послужить основой для дальнейшей разработки патогенетических методов клеточной терапии РС.

Цель исследования - изучить влияние различных методов клеточной терапии на динамику неврологического статуса и патоморфологических данных на модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ).

Материалы и методы. В исследование были включены 36 лабораторные крысы-самки линии Wistar, массой 150–180 г, на которых была создана модель ЭАЭ. С целью индукции ЭАЭ использовали метод активной подкожной иммунизации животных иммуногенной смесью, содержащей гомогенат спинного мозга в качестве иммуногена, который в равных пропорциях эмульгировали в модифицированном полном адьюванте Фрейнда (Sigma, Германия), содержащем *M. tuberculosis* в концентрации 5 мг/мл. Клинико-неврологическая оценка тяжести развития ЭАЭ у животных проводилась согласно 6-бальной системе международных критериев (S. Pluchino, 2003).

Для выполнения культуральных исследований проводили выделение моноклеарных клеток из костного мозга крыс. Культивирование МСК осуществляли в полной культуральной среде, содержащей DMEM-LG («Gibco», Германия), 10% эмбриональную телячью сыворотку, 1% антибиотика-антимикотика и 2mM-глутамин («Sigma», Германия), при 37°C и 5% CO₂. Для изучения миграции МСК после трансплантации лабораторным крысам выполняли окрашивание МСК с использованием флуоресцентного красителя PKH26 (Sigma, Германия).

В зависимости от метода лечения все лабораторные животные с клиническими проявлениями ЭАЭ были подразделены на 4 группы. Первой группе крыс (n=14) на 12-й день после иммунизации вводили суспензию МСК в центральную вену хвоста в концентрации 1*10⁶ МСК на крысу. Второй группе крыс (n=10) на 11-й день после иммунизации с целью иммуносупрессии вводили циклофосфамид (ЦФ) в дозе 200 мг/кг внутривнутрибрюшинно. На 12-й день проводили совместную трансплантацию МСК и ГСК в соотношении 1:20 в центральную вену хвоста. Третьей группе (n=8) на 11-й день после иммунизации вводили ЦФ внутривнутрибрюшинно в аналогичной дозировке. На следующий день проводили перфузию ГСК в концентрации 2*10⁷ клеток на крысу в центральную вену хвоста. Контрольной группе крыс с

клиническими проявлениями ЭАЭ (n=4) вводили аликвоту 0,9% раствора NaCl в центральную вену хвоста. Период наблюдения составил 42 дня.

Патоморфологическое исследование головного и спинного мозга крыс с ЭАЭ проводили с использованием методов окраски гематоксилин-эозином, по Клювер-Барреру (по модификации Викторова) и MSB.

Для статистического анализа использовался листинг программы STATISTICA 6.0 (критерий Колмогорова-Смирнова, коэффициент асимметрии (Skewness) и коэффициент эксцесса (Kurtosis), непараметрические критерии Вилкоксона (в случае зависимых переменных) и Манна-Уитни (в случае независимых переменных). Результаты представляли в формате Me (25-й ÷ 75-й процентиля). Во всех случаях результаты принимали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. *Динамика клинической картины ЭАЭ у крыс.* Клиническая картина ЭАЭ у лабораторных животных контрольной группы характеризовалась неуклонным прогрессированием заболевания, проявляющимся нарастанием симптоматики, что привело к гибели всех животных на 14-е сутки после моделирования ЭАЭ.

Применение всех схем лечения сопровождалось статистически значимым регрессом неврологической симптоматики по сравнению с контрольной группой, уже начиная со следующих суток от начала терапии ($p < 0,05$). Во всех группах крыс, которые получали лечение, рецидивов заболевания в течение 30 суток после введения стволовых клеток не было (рисунок 1).

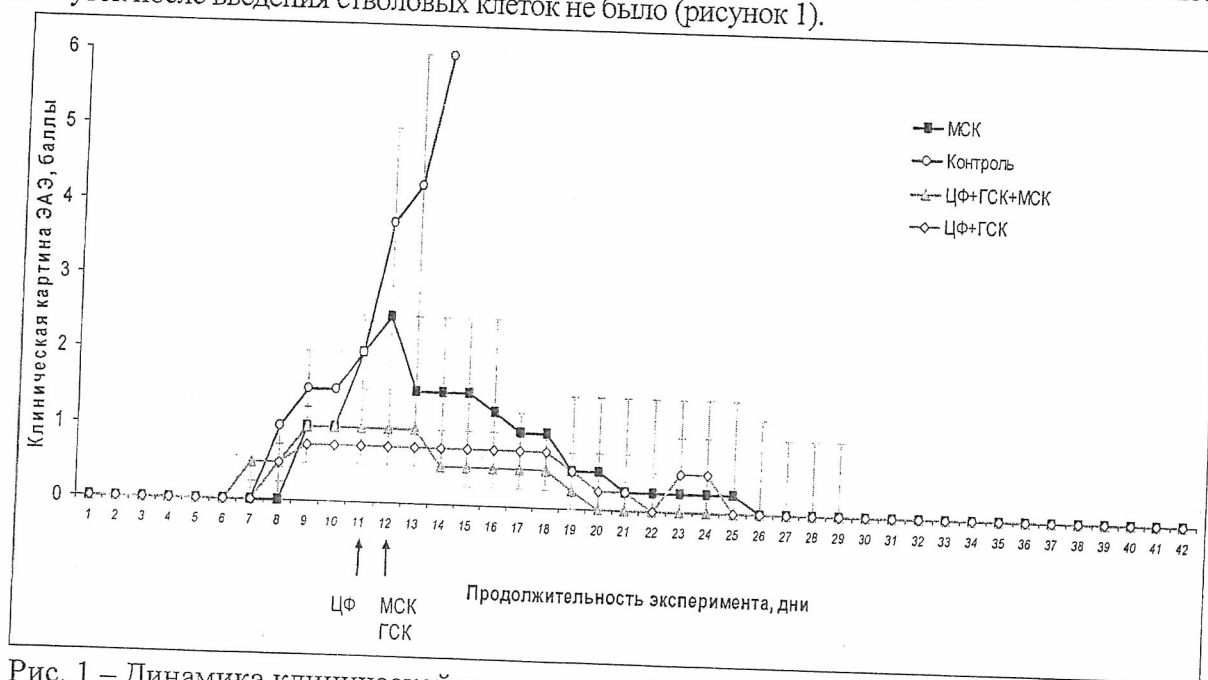


Рис. 1 – Динамика клинической картины у лабораторных животных с ЭАЭ до и после лечения

По оси X – Продолжительность эксперимента, дни; по оси Y – Клиническая картина ЭАЭ, баллы

У крыс с ЭАЭ применение совместной трансплантации МСК и ГСК после высокодозной химиотерапии (ВХТ) характеризуется наиболее низким уровнем летальности (20%) по сравнению с трансплантацией МСК (28,6%) и ЦФ+ГСК (75%) и приводит к полному регрессу клинической картины ЭАЭ на 8-е сутки после трансплантации, тогда как после трансплантации МСК и лечения ЦФ+ГСК – на 14-е и 10-е сутки соответственно. Таким образом, использование ко-трансплантации МСК и ГСК после иммуносупрессивной терапии для лечения ЭАЭ характеризуется более низкой частотой осложнений по сравнению с применением ЦФ+ГСК, что может объясняться протективным эффектом МСК за счет возможной экспрессии регуляторных молекул и трофического воздействия, которые способствуют выживаемости кроветворных клеток

Патоморфологический анализ образцов головного и спинного мозга лабораторных животных с клинической картиной ЭАЭ. Клиническая эффективность применяемых схем лечения по сравнению с контрольной группой подтверждалась уменьшением выраженности воспалительной реакции и степени демиелинизации ($p < 0,0$ оцениваемых по качественным характеристикам и количественно).

Только в контрольной группе крыс при гистологическом анализе спинного и головного мозга выявлялась выраженная воспалительно-сосудистая реакция (3(3÷3) балла, $p < 0,01$) образованием периваскулярных инфильтратов из лимфогистиоцитов и моноцитов. Вокруг сосудов с воспалительно-сосудистой реакцией отмечалось наиболее заметное поражение нейронов, что проявлялось тяжелыми дистрофическими изменениями (выражены хроматолиз, тигролиз, кариорексис), некрозами, формированием клеточных тяжей, явлениями сателлитоза и нейронофагии (3(3÷3) балла, $p < 0,01$). В спинном и головном мозге лабораторных животных, которым были трансплантированы МСК, выявлена слабая выраженная мезенхимально-глиальная воспалительная реакция (0,5(0÷1) балла, $p < 0,01$) представленная преимущественно пролиферативными элементами с единичными лимфоцитарными клетками, что может свидетельствовать об угасании воспалительной реакции и общем переходе воспаления в продуктивную фазу. При этом отмечалось отсутствие демиелинизации либо вакуолизация миелиновых оболочек (0,75(0,25÷1) балла, $p < 0,01$). Патоморфологический анализ спинного и головного мозга лабораторных животных в группе ЦФ+ГСК+МСК обнаружил отсутствие васкулитов 0(0÷0) баллов, $p < 0,01$, а также отсутствие демиелинизации либо вакуолизацию миелиновых оболочек (1(1÷2) балл, $p < 0,01$). В группе ЦФ+ГСК васкулитов в спинном и головном мозге выявлено не было (0(0÷0) баллов, $p < 0,01$), однако отмечалась незначительная демиелинизация (2 (1÷2) балла, $p < 0,01$).

Таким образом, при гистологическом анализе образцов головного и спинного мозга лабораторных животных с клинической картиной ЭАЭ статистически значимых различий между группами, получавшими лечение, не выявлено. Использование всех схем лечения приводило к подавлению воспалительной реакции, а также к торможению процессов демиелинизации.

Миграция МСК после трансплантации. При помощи иммунофлуоресцентного анализа замороженных срезов спинного и головного мозга было обнаружено наличие РКН26-позитивных МСК в ЦНС. Наиболее выраженный пик флуоресценции окрашенных МСК был обнаружен в селезенке и лимфатических узлах на 30 сутки после трансплантации, что указывает на повышенную миграцию данных клеток в периферические лимфоидные органы. В печени наблюдалось лишь незначительное количество РКН26-позитивных МСК. В почках МСК обнаружены не были. Таким образом, полученные результаты не только подтверждают миграцию МСК в лимфоидные органы, но и свидетельствуют об их пенетрации в ЦНС. Последнее, с учетом биологических свойств МСК, указывает на перспективность дальнейшего изучения их нейрорегенераторного вектора, в том числе при демиелинизирующих заболеваниях ЦНС.

Выводы:

1. У крыс с ЭАЭ трансплантация стволовых клеток сопровождалась регрессом неврологической симптоматики, а также уменьшением воспалительной реакции и степени демиелинизации по сравнению с контрольной группой.
2. Впервые доказано, что у крыс с ЭАЭ применение совместной трансплантации МСК и ГСК после высокодозной химиотерапии характеризуется наиболее низким уровнем летальности (20%) по сравнению с трансплантацией МСК (28,6%) и высокодозной химиотерапией с поддержкой трансплантацией ГСК (75%) и приводит к полному регрессу клинической картины ЭАЭ в более ранние сроки (на 8-ые, сутки после трансплантации по сравнению с 14-ми сутками при трансплантации МСК и 10-ми сутками после высокодозной химиотерапии с поддержкой трансплантацией ГСК).