

МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И ПЕРСПЕКТИВА ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА

УО «Белорусский государственный медицинский университет»¹,

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии²

*В обзоре рассмотрены возможные перспективы использования клеточной терапии для лечения atopического дерматита, а также преимущества применения с этой целью мезенхимальных стволовых клеток. Проанализированы результаты применения клеточной терапии для лечения atopического дерматита в проведенных и проводимых на сегодняшний день доклинических и клинических испытаниях. Выявлены иммуномодулирующие свойства данного типа стволовых клеток по отношению к иммунокомпетентным клеткам в условиях *in vitro*, а также системный противовоспалительный эффект в экспериментах *in vivo*. Положительные результаты применения мезенхимальных стволовых клеток в экспериментах *in vivo*, а также отсутствие побочных эффектов (согласно литературным источникам), позволяют рассматривать данный подход как один из наиболее перспективных методов терапии atopического дерматита.*

Ключевые слова: atopический дерматит, мезенхимальные стволовые клетки.

A. Y. Hancharou, V. U. Symanovich

MESENCHYMAL STEM CELLS AND THE PERSPECTIVE OF ITS APPLICATION IN THE TREATMENT OF ATOPIC DERMATITIS

*In the current review possible prospects of cellular therapy for the treatment of atopical dermatitis, as well as the advantages of mesenchymal stem cells, were considered. The results of the application of cellular therapy for the treatment of atopical dermatitis in the continuing and in the conducted preclinical and clinical trials were analyzed. Immunomodulatory properties of this type of stem cells in relation to the immune cells *in vitro*, as well as systemic anti-inflammatory effect in the *in vivo* experiments, have been revealed. The positive results of *in vivo* experiments using the mesenchymal stem cells as a treatment of the atopical dermatitis, as well as the absence of side effects (according to the literature), allows to consider this approach as one of the most promising methods of therapy of atopical dermatitis.*

Key words: atopical dermatitis, mesenchymal stem cells.

Актуальность проблемы. Атопический дерматит (АД) (L20 по МКБ-10) представляет собой многофакторное хроническое воспалительное заболевание кожи аллергической природы. Однако, несмотря на главенствующую роль аллергических механизмов, элиминация аллергенов не всегда приводит к ремиссии, при этом, во многих случаях, наблюдается отсутствие корреляционной связей между количественным содержанием IgE и тяжестью заболевания. Лечение АД и в настоящее время, как правило, носит симптоматический характер и зависит

обширности поражения, тяжести процесса, а также от наличия сопутствующих инфекций.

В основе терапии лежит местное, а в случае тяжелого течения – системное применение глюкокортикоидов и цитостатиков. Однако, данный подход позволяет улучшить лишь общее состояние пациентов, при редко отмечающейся стойкой ремиссии заболевания.

В последние два десятилетия для лечения онкологических, аутоиммунных и аллергических заболеваний широкое применение получили иммунобиологические лекарственные средства на основе

моноклональных антител. Для лечения АД были предложены моноклональные антитела к цитокинам (интерлейкину(ИЛ)-5, ИЛ-13, ИЛ-17а, ИЛ-12/ИЛ-23, ИЛ-22, фактору некроза опухолей- α , тимическому стромальному лимфопоэтину), цитокиновым рецепторам (ИЛ4-R α , ИЛ6-R, ИЛ31-R α), адгезивным молекулам (LFA-1), Ig-E и даже молекуле CD20 (ритуксимаб). Многие лекарственные средства этой группы показали свою неэффективность (ритуксимаб, инфликсимаб, омализумаб, эфализумаб), в то время, как другие – обнадеживающие результаты. Так, например, в настоящее время ведутся клинические испытания применения моноклональных антител (немолизумаб) специфичных к рецептору ИЛ-31 [17]. Полученные данные свидетельствуют о снижении зуда и площади пораженных участков [17]. Дупилумаб – лекарственное средство на основе моноклонального антитела к α -рецептору ИЛ-4, связывая который, происходит блокировка сигнальных путей ИЛ-4 и ИЛ-13, имеющее важное значение в патогенезе АД [24]. Препарат показал высокую эффективность в лечении тяжелой и среднетяжелой форм АД и одобрен к применению Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA) США. Вместе с тем, показано, что дупилумаб может сам вызывать аллергические реакции и другие нежелательные явления.

Таким образом, актуальным остается вопрос о поиске более эффективных, безопасных и финансово доступных методов лечения АД. В качестве альтернативного подхода с целью терапии данного заболевания некоторые авторы рассматривают применение стволовых клеток.

Стволовые клетки. С момента получения и описания свойств плюрипотентных эмбриональных стволовых клеток из внутренней клеточной массы бластоциста проводится большое количество *in vitro* исследований, доклинических и клинических испытаний, направленных на изучение возможностей применения стволовых клеток в различных областях медицины. Известно, что наибольшим потенциалом к дифференцировке (тотипотентность – до 250 линий) и неограниченной способностью к пролиферации обладают эмбриональные стволовые клетки. Однако их применение ограничено этическими проблемами, и сопряжено, по некоторым данным, с онкогенным риском [11].

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки, которые получают посредством введения (с помощью вирусных векторов) генов 4-х транскрипционных факторов: Oct4/3, Sox2, Klf4, c-Myc – «факторов Яманака», представляют значительный интерес для дальнейшего использования в медицине [20]. Основными недостатками применения индуцированных стволовых клеток являются не только трудоемкость и дороговизна методов получения клеточных продуктов на их основе, но и нестабильность генома, что приводит к частому озлокачанию клеток [11].

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК). Наибольшее количество исследований в последние 15 лет посвящено оптимизации протоколов получения, исследования иммуномодулирующих свойств, а также изучению перспектив использования МСК в регенеративной медицине и лечении ряда заболеваний. МСК – это стромальные негематopoэтические прогениторные клетки, которые находятся в различных тканях как взрослого организма, так и плода. На данный момент МСК получают из: костного мозга, жировой ткани, амниотической жидкости, амниотической мембраны, пульпы, эндометрия, периферической крови, плаценты и фетальной мембраны, пупочного канатика, синовиальной жидкости, слюнных желез, желе Вортмана, менструальной крови, кожи и подкожной клетчатки, обонятельной выстилки. Таким образом, МСК представляют собой достаточно гетерогенную популяцию, включающую клетки, свойства и функция которых отличаются в зависимости от источников получения, методов выделения и культивирования.

Дифференцировочный потенциал данных стволовых клеток изначально достаточно высок и может быть расширен в условиях *in vitro* в зависимости от условий культивирования (питательная среда, ростовые факторы) в результате чего возможно получить клетки всех 3-х зародышевых листков: эндодермального (гепатоциты, инсулинпродуцирующие β -клетки поджелудочной железы), мезодермального (фибробласты, кардиомиоциты), эктодермального (нейроциты).

В связи с гетерогенностью, отсутствием определенных маркеров, а также различиями в фенотипическом профиле в зависимости от источника получения клеток в 2006 г. Международным обществом клеточной терапии были определены минимальные критерии МСК: 1) образование адгезионных культур при стандартных условиях культивирования; 2) способность дифференцироваться в остеобласты, адипоциты и хондробласты *in vitro*; 3) иммунофенотип: наличие экспрессии молекул CD73, CD90, CD105 и отсутствие – CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79a и HLA-DR [10].

В различных исследованиях показано, что помимо вышеперечисленных маркеров на МСК часто наблюдается экспрессия молекул CD29 и CD44, CD146, CD140b, в зависимости от тканевого происхождения [22]. Одним из наиболее значимых позитивных маркеров является Stro-1, антитела к которому используются для идентификации МСК в клеточных культурах и тканевых срезах. Для их выделения методом магнитной сепарации помимо антител к Stro-1 используют антитела к CD105 (SH-2), ALCAM (CD166) (SB-1), и к CD73 (SH-3 и SH-4). Также на МСК представлены молекулы адгезии: VCAM-1 (CD106), ICAM-1 (CD54), LFA-3 (CD53), и интегрины с высоким уровнем экспрессии – α 1, α 5, β 1, и низким – α 2, α 3, α 6, β 2, β 4, β 5 [3]. При этом наблюдается низкая экспрессия МНС I класса, и отсутствие экспрессии МНС II класса (за исключением условий стимуляции цитокинами в высоких концентрациях, например, ИФН- γ).

МСК, получаемые из различных тканевых источников, отличаются как иммунофенотипически, так и функционально [22]. Дифференцировочный потенциал в значительной степени определяется источником получения клеток. МСК обонятельной выстилки человека слабо склонны к дифференцировке в хондро- и остеогенном направлении, но также могут быть дифференцированы в адипо- и нейроглиальном направлении [2]. Тогда как, МСК, полученные из плаценты и фетальной оболочки, демонстрируют более высокую пролиферативную активность и способность к дифференцировке в остеогенном направлении, по сравнению с клетками, выделенными из костного мозга. При этом клетки, выделенные из амниотической жидкости, показали высокую способность к дифференцировке в эндотелиоциты и кардиомиоциты, в связи с чем обсуждается их применение в клеточной терапии сердечно-сосудистых заболеваний [8].

Иммуномодулирующие свойства МСК. Мультипотентность, способность к самоподдержанию, а также способность клеток ускользать от иммунного ответа позволили использовать МСК как в регенеративной медицине, так в лечении аутоиммунных заболеваний. Для последних немаловажную роль играет еще одно свойство МСК, доказанное экспериментально *in vitro* и *in vivo* – иммуномодулирующий эффект в отношении практически всех типов иммунокомпетентных клеток: Т- и В-лимфоцитов, натуральных киллеров, моноцитов и макрофагов, дендритных клеток, нейтрофилов. Так, известно, что совместное культивирование МСК и мононуклеаров периферической крови приводит к снижению митоген-индуцированной пролиферативной активности клеток, уменьшению синтеза ИФН- γ и ИЛ-17, и увеличению продукции трансформирующего росткового фактора – 1 β (ТРФ-1 β) и ИЛ-10 [6]. Известна их способность усиливать иммунный ответ по пути Т-хелперов 2 (Тх2), а именно посредством регуляции продукции ИЛ-4 и ИФН- γ [9]. В экспериментах с использованием животных моделей введение МСК *in vivo* способствовало восстановлению популяции Т-регуляторных лимфоцитов [14], и снижению содержания Тх17-клеток. Схожие результаты, а именно увеличение содержания Т-регуляторных клеток, были получены при введении аллогенных или аутологичных МСК пациентам с системной красной волчанкой [24].

Установлено, что взаимодействие МСК с натуральными киллерами в условиях культуры приводит к изменению фенотипа клеток, снижению их пролиферативной активности, продукции цитокинов и цитотоксических эффекторных белков: гранзима В и перфорина [4]. МСК эффективно подавляют способность натуральных киллеров вызывать апоптоз клеток-мишеней [4].

Совместное культивирование показало ингибирующий эффект МСК на индуцированную дифференцировку моноцитов в дендритные клетки, а также на функциональную активность полученных клеток:

отсутствие или сниженную экспрессию поверхностных маркеров зрелых клеток (CD86, CD83, HLA-DR), наличие на мембране антигенов, ассоциированных с толерогенными свойствами (CD85к, коингибиторные молекулы семейства В7), неспособность к продукции ИЛ-12, а также супрессивный эффект на активацию и пролиферацию Т-лимфоцитов [7, 12, 23].

Ранее показано, что МСК обонятельной выстилки человека оказывают схожее действие на антигенпредставляющие клетки как миелоидного, так и лимфоидного происхождения (В-клетки, макрофаги, моноцитарные дендритные клетки), что проявляется в снижении, экспрессии маркеров иммуногенной активации. МСК индуцируют у В-клеток иммунофенотип CD86^{lo}CD80^{hi}HLA-DR^{lo}CD85к^{hi}, направляют дифференцировку моноцитов в М2-подобные макрофаги, стимулируют формирование у незрелых моноцитарных дендритных клеток толерогенного иммунофенотипа (CD86^{lo}CD80^{hi}HLA-DR^{lo}CD273^{hi}CD85к^{hi}) [1, 5, 7, 12, 23].

В большинстве экспериментов *in vitro* доказан ингибирующий эффект на пролиферацию иммунокомпетентных клеток при совместном культивировании с культурой МСК. Однако, присутствие МСК предотвращало гибель клеток от апоптоза [15], что ассоциировалось со снижением на поверхности клеток молекул CD279 (PD-1) и CD366 (Tim-3). Предположительный механизм антиапоптотического эффекта может быть связан с продукцией цитокина ИЛ-6, что в свою очередь приводит к активации фактора транскрипции STAT-3 [16]. При этом МСК снижало продукцию активных форм кислорода нейтрофилами, однако, не оказывало влияния на фагоцитарную активность клеток, хемотаксис (в ответ на продукцию ИЛ-8, f-MLP, C5a) и экспрессию молекул адгезии [16].

Молекулярные механизмы влияния МСК на иммунокомпетентные клетки изучены недостаточно. Установлена роль простагландина E2, оксида азота, индоламин 2,3-диоксигеназу (IDO), ИЛ-10, ТРФ-1 β в проявлении МСК иммуносупрессивных свойств. Активно дискутируется роль коингибиторных молекул семейства В7 (В7-DC, В7-H1-7) [1, 3, 7, 12].

Мультипотентность, иммуномодулирующий и паракринный трофический эффекты, продукция противовоспалительных веществ – все это позволило применять МСК в клеточной терапии ряда заболеваний аутоиммунной природы, воспалительных и дегенеративных. Клеточная терапия с применением МСК в настоящее время широко используется на практике.

Доклинические и клинические испытания МСК в лечении АД. Новый подход в терапии АД связан с клеточными технологиями, а именно с применением МСК: в 2017 г. опубликовано исследование Tae-Hoon Shin с соавторами, в котором изучили эффективность и безопасность внутривенного введения МСК, полученных из жировой ткани человека (были использованы образцы, полученные от 5 здоровых доноров), для лечения АД NC/Nga мыши [19]. Клетки

вводили на 21-й день после начала сенсибилизации аллергенами *Dermatophagoides farinae* (Df), внутривенно в низкой (2×10^5 клеток) и высокой (2×10^6 клеток) дозах. Каких-либо негативных побочных эффектов не было выявлено. Клеточная терапия с применением МСК приводила к дозозависимому снижению содержания Ig-E, снижению гиперплазии и клеточной инфильтрации иммунокомпетентными клетками поврежденных областей. Однако при внутривенном введении клетки распределяются неравномерно. В большинстве случаев, через 2 часа после введения, МСК определялись в легких, и реже – в других органах: почках, сердце, крови, а также в селезенке. Спустя 3 дня после введения – клетки определялись лишь в 50 % случаев, при этом наиболее часто МСК фиксировали в сердце. На 2 и 4 недели после внутривенного введения МСК не были выявлены. Можно предположить, что более эффективным было бы местное применение МСК на пораженных участках кожи [19].

В другом исследовании внутривенное введение МСК, полученных из костного мозга, в мышинной модели (BALB/c) овалбумин-индуцированного аллергического ринита привело к снижению выраженности аллергической симптоматики, снижению содержания специфических Ig-E, продукции цитокинов T52 типа, регуляторного цитокина (ИЛ10) [25]. Каких-либо нежелательных побочных эффектов не было выявлено. Схожие результаты были получены Sun YQ. с соавторами, при использовании в клеточной терапии аллергической патологии МСК, полученных из костного мозга, а также МСК, полученных из индуцированных стволовых плюрипотентных клеток [21].

Таким образом, использование МСК в лечении АД на животных моделях показало положительный эффект.

Что касается клинических испытаний, то в исследовании Kim H. S. с соавторами, датированным 2017 г. МСК пупочного канатика вводили подкожно в низких и высоких дозах: $2,5 \times 10^7$ и 55×10^7 соответственно [13]. В результате был выявлен дозозависимый эффект применения, наиболее выраженный при введении высоких концентраций, таким образом, у 55 % пациентов наблюдалось снижение EASI на 50 %, IGA и SCORAD на 33 % и 50 % соответственно. Также наблюдалось снижение содержания Ig-E и общего количества эозинофилов. На основе полученных данных ведутся новые клинические исследования, с применением терапевтически эффективной концентрации и выбранного источника клеток. В незавершенной стадии (I-я фаза клинических исследований, информация с портала ClinicalTrials.gov), находится также исследование клинической эффективности внутривенного введения аутологичных МСК пациентам с АД в следующих дозах: 1×10^8 и 3×10^8 [18].

Таким образом, высокая заболеваемость АД и отсутствие на сегодняшний день эффективных и доступных лекарственных средств и методов лечения, диктует необходимость поиска новых способов тера-

пии этого заболевания. МСК обладают доказанными иммунорегуляторными свойствами в отношении иммунокомпетентных клеток, а их применение безопасно, что подтверждено многочисленными клиническими исследованиями. Локальное или системное применение МСК для лечения АД является новым перспективным и достаточно доступным методом лечения этого заболевания, значительно ухудшающего качество жизни пациентов.

Литература

1. *Антоневич Н. Г.* Влияние мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки человека на иммунотип В-клеток / Н. Г. Антоневич [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. Вып. 10 / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, Респ. науч.-практ. центр эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л. П. Титова. – Электрон. текстовые дан. – Минск: ГУ РНМБ, 2017. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM). – С. 270–276.
2. *Антоневич Н. Г.* Дифференцировочный потенциал мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки человека / Н. Г. Антоневич [и др.] // Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа. – 2017. – Т. 3, № 4. – С. 667–674.
3. *Антоневич Н. Г.* Иммунофенотипическая характеристика мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки носовой полости человека / Н. Г. Антоневич [и др.] // Весті НАН Беларусі. Сер. мед. навук. – 2015. – № 1. – С. 42 – 49.
4. *Антоневич Н. Г.* Подавление цитотоксической функции CD8+ Т-лимфоцитов и натуральных киллерных клеток мезенхимальными стволовыми клетками обонятельной выстилки человека / Н. Г. Антоневич [и др.] // Весті НАН Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – № 4. – С. 15–24.
5. *Антоневич, Н. Г., Гончаров А. Е.* Влияние мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки человека на дифференцировку макрофагов *ex vivo* / Н. Г. Антоневич, А. Е. Гончаров // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. Вып. 9 / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, Респ. науч.-практ. центр эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л. П. Титова. – Электрон. текстовые дан. – Минск: ГУ РНМБ, 2016. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM). – С. 185–190.
6. *Антоневич, Н. Г., Гончаров А. Е., Чекан В. Л.* Иммуносупрессивные свойства культивируемых эктомезенхимальных стволовых клеток обонятельного эпителия человека // Здравоохранение. – 2014. – № 10. – С. 14–19.
7. *Гончаров А. Е., Антоневич Н. Г., Чекан В. Л.* Влияние мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки на антигенный профиль дендритных клеток // Новости медико-биологических наук. – 2015. – Т. 10, № 3. – С.102–106.
8. *Смолянинов А. Б.* Мезенхимальные стволовые клетки: перспективы применения в кардиологии / А. Б. Смолянинов [и др.] // Кардиологический вестник. – 2013. – № 2. – С. 5–12.
9. *Aggarwal S., Pitterger M. F.* Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses / S. Aggarwal, M. F. Pitterger // Blood. – 2005. – Vol.105, № 4. – P. 1815–1822.
10. *Dominici M.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici [et al.] // Cytotherapy. – 2006. – Vol.8. – P. 315–317.

11. Ghosh Z. Dissecting the oncogenic potential of human embryonic and induced pluripotent stem cell derivatives / Z. Ghosh [et al.] // *Cancer Res.* – 2011. – Vol. 71, № 14. – P. 5030–5039.
12. Hancharou A. Y., Antonevich N. H., DuBuske L. M. Mesenchymal stem cell induce tolerogenic dendritic cells which inhibit proliferation of autologous T-cells / A. Y. Hancharou, N. H. Antonevich, L. M. DuBuske // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2017. – Vol. 139, № 2. – P. AB269.
13. Kim H. S. Clinical trial of human umbilical cord blood-derived stem cells for the treatment of moderate-to-severe atopic dermatitis: phase I/IIa studies / H. S. Kim [et al.] // *Stem cells.* – 2017. – Vol. 35, № 1. – P. 248–255.
14. Luz-Crawford P. Mesenchymal stem cells generate a CD4+CD25+Foxp3+regulatory T-cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells / P. Luz-Crawford [et al.] // *Stem Cells Res. Ther.* – 2013. – Vol. 4, № 3. – P. 65.
15. Magbool M. Human mesenchymal stem cells protect neutrophils from serum-deprived cell death / M. Magbool [et al.] // *Cell Biol. Int.* – 2011. – Vol. 35, № 12. – P. 1247–1251.
16. Raffaghello L. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche / L. Raffaghello [et al.] // *Stem Cells.* – 2008. – Vol. 26, № 1. – P. 151–162.
17. Ruziska T. Anti-interleukin-31 receptor a antibody for atopic dermatitis / T. Ruziska [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2017. – Vol. 376. – P. 826–835.
18. Safety and Efficacy of ADETEM ing. in patients with moderately subacute and chronic atopic dermatitis [Electronic resource] / Mode of access: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02888704>. – Date of access: 22.12.2017.
19. Shin T. H. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells alleviate atopic dermatitis via regulation of B-lymphocyte maturation / T. H. Shin [et al.] // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8, № 1. – P. 512–522.
20. Stadtfeld M. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration / M. Stadtfeld [et al.] // *Science.* – 2008. – Vol. 322, № 5903. – P. 945–949.
21. Sun Y. Q. Human pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells prevent allergic airway inflammation in mice / Y. Q. Sun [et al.] // *Stem Cells.* – 2012. – Vol. 30, № 12. – P. 2692–2699.
22. Ullah I., Subbarao R. B., Rho G. J. Human mesenchymal stem cells- current trends and future prospective [Electronic resource] / I. Ullah, R. B. Subbarao, G. J. Rho // *Bioscience reports.* – 2015. – Vol. 28, № 35 (2). – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4413017>. – Date of access: 21.12.2017.
23. Vakharia P. P., Silverberg, J. I. Monoclonal Antibodies for Atopic Dermatitis: Progress and Potential / P. P. Vakharia, J. I. Silverberg // *BioDrugs.* – 2017. – Vol. 31, № 5. – P. 409–422.
24. Wang D. The regulation of the Treg/Th17 balance by mesenchymal stem cells in human systemic lupus erythematosus / D. Wang [et al.] // *Cell. Mol. Immunol.* – 2017. – Vol. 14. – P. 423–431.
25. Zhao N. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduce immune reaction in a mouse model of allergic rhinitis / N. Zhao [et al.] // *Am. J. Transl. Res.* – 2016. – Vol. 8, № 12. – P. 5628–5636.