

Н. Н. Данилкович*

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСПЛАНТАТА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ДЛЯ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ЭПИЛЕПСИИ

Научные руководители: канд. мед. наук, доц. С. М. Космачева*,

ст. преп. О.С. Никитина

Кафедра нормальной физиологии,

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

** «РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий», г. Минск*

Резюме. *Терапия стволовыми клетками для неизлечимых расстройств центральной нервной системы давно рассматривается как перспективный терапевтический вариант. Мезенхимальные стволовые клетки обладают уникальными иммуномодулирующими свойствами и являются безопасным и перспективным кандидатом на клеточную терапию для резистентной эпилепсии.*

Ключевые слова: *мезенхимальные стволовые клетки, эпилепсия, клеточная терапия.*

Resume. *Stem cell therapy for incurable central nervous system disorders has long been viewed as a promising therapeutic option. Mesenchymal stem cells possess unique immunomodulatory properties and are a safe and promising candidate for cell therapy in resistant epilepsy.*

Keywords: *mesenchymal stem cells, epilepsy, cell therapy.*

Актуальность. Эпилепсия относится к числу наиболее распространенных неврологических заболеваний. Патогенез эпилепсии характеризуется первичным локальным повреждением межнейрональных связей головного мозга или генетически обусловленной нейродегенерацией. В последнее десятилетие активно разрабатываются методы клеточной терапии основных заболеваний человека с использованием мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Механизмы положительного действия связаны с противовоспалительным действием МСК, продукцией факторов роста и противоапоптотических цитокинов [1].

Цель: получение клеточных трансплантатов на основе аутологичных МСК костного мозга для лечения фармакорезистентной эпилепсии.

Задачи:

1. оценить эффективность наращивания МСК костного мозга человека в присутствии сыворотки АВ (IV) человека;
2. разработать критерии качества клеточных трансплантатов для внутривенного и эндолюмбального введения;
3. определить уровень экспрессии маркеров нейрогенеза неиндуцированных и нейроиндуцированных МСК.

Материал и методы. Забор костного мозга осуществляли путем пункции подвздошной кости. МСК выделяли из фракции мононуклеаров костного мозга методом деления на градиенте плотности фиколл-пак и наращивали в полной питательной среде на основе α -MEM с рибонуклеазидами, 2мМ глутамина, 5% сыворотки АВ (IV), 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина на протяжении 2-3 пассажей. Для трансплантата с нейроиндуцированными МСК, часть переводили на индукционную среду DMEM F12 KnockOut с добавлением Neural Supplement, bFGF (20 нг/мл), EGF (20 нг/мл) в течение 6 дней. После завершения культивирования и нейроиндукции клетки, предназначенные для трансплантации, снимали с адгезионной поверхности 0,25% раствором трипсина с ЭДТА, дважды

отмывали раствором натрия хлорида изотоническим 0,9% для инфузий с 1% сыворотки пациента. Неиндуцированные МСК для в/в введения суспендировали в 20 мл, а нейроиндуцированные для эндолюмбального введения в 5 мл раствора натрия хлорида изотонического 0,9% для инфузий с добавлением 5% аутологичной сыворотки. Отбирали часть суспензии для подсчета и определения жизнеспособности, контроля стерильности, для определения фенотипа и контроля экспрессии нейромаркеров.

Для определения уровня экспрессии маркеров нейрогенеза образцы РНК, выделенные до и после нейрогенной индукции, подвергали обратной транскрипции и полученную одноцепочечную кДНК анализировали методом ПЦР в реальном времени. В качестве молекулярных маркеров применяли нейрон-специфическую енолазу (NSE), нестин (NES) и ассоциированный с микротрубочками белок 2 (MAP2). Расчет эффективности реакции проводили с помощью программы LinRegPCR. Жизнеспособность клеток оценивали окрашиванием раствором трипанового синего. Методом проточной цитофлуориметрии определяли фенотип полученной культуры по поверхностным маркерам: CD105, CD90, CD45, CD34.

Результаты и их обсуждение. Нарращивание МСК провели из 3-х образцов пунктата костного мозга в присутствии 5% АВ (IV) сыворотки и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) в течение 7 дней (таблица 1).

Таблица 1. Проплиферация МСК в присутствии сыворотки АВ (IV) и ЭТС

№	Кол-во МСК (тыс.)		
	Исходное кол-во	Конечное кол-во	
		АВ (IV)	ЭТС
ср.зн.±ст.ош.	4,62±0,01	11,3±0,5*	8,9±0,7

Проведенные нами сравнение количества клеток полученных через 7 дней при добавлении в среду 5% АВ (IV) сыворотки или 10% ЭТС показало, что культивирование МСК в присутствии сыворотки человека эффективнее в 1,9 раз (n=3, p<0.05), чем сыворотки животного происхождения.

По результатам собственных исследований и данных литературы [2, 3] были определены критерии оценки качества клеточных трансплантатов для внутривенного и эндолюмбального введения. Трансплантаты для клинического применения представляли собой суспензию интактных или нейроиндуцированных МСК 2-3 пассажей (рисунок 1) в растворе натрия хлорида изотоническом 0,9% для инфузий с добавлением 5% аутологичной сыворотки; жизнеспособность клеток 97-99%; фенотип по маркерам CD90⁺>95%, CD105⁺>95%, CD34⁺<5%, CD45⁺<5%; трансплантаты стерильны, отсутствуют маркеры вируса гепатита В, вируса гепатита С и вируса иммунодефицита человека. Объем трансплантата для в/в введения - 20 мл, клеточность 47,0 – 72,0x10⁶/клеток; объем трансплантата для эндолюмбального введения - 5 мл, клеточность 8,0– 10,0x10⁶/клеток.

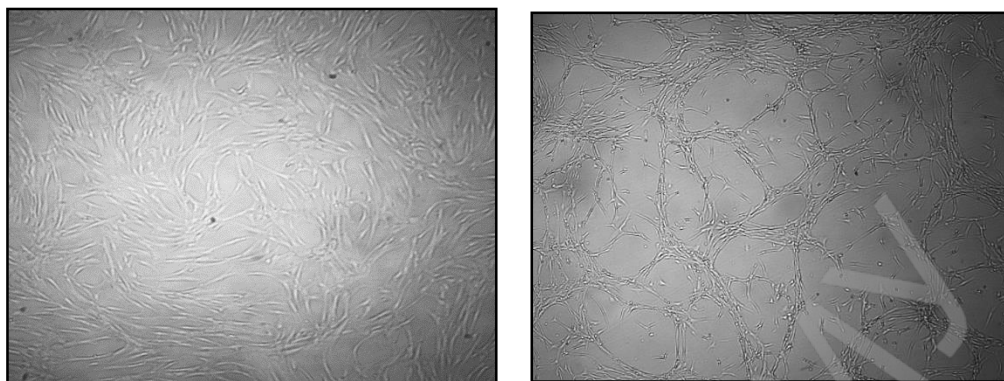


Рисунок 1 – Мезенхимальные стволовые клетки 2 пассажа (ув. x100): а – интактные и б – нейроиндуцированные

Трансплантат нейроиндуцированных МСК получали путем культивирования МСК в нейроиндукционной среде с добавлением ростовых факторов. Эффективность нейроиндукции определяли по уровню экспрессии специфических маркеров нейрогенеза (таблица 2).

Таблица 2. Экспрессия нейрогенных маркеров индуцированными МСК

Пациент	Кратность изменения экспрессии по сравнению с интактными МСК		
	NSE	NES	MAP2
БАН	2,04	12,46	2,85
СЯА	1,62	6,2	6,81
ПКИ	1,45	14,44	2,08
МВВ	1,24	17,3	5,06

Культивирование МСК в нейроиндукционной среде в течение 6 дней приводит к увеличению экспрессии мРНК нейро-специфической енолазы, нестина и MAP-2. Енолаза и нестин – маркеры нервных клеток, свидетельствующие о приобретении МСК костного мозга характеристик нейроподобных клеток. Увеличение экспрессии MAP-2 в культурах нейродифференцированных МСК характеризует процесс формирования отростков аксонов.

Выводы:

1 Разработана технология наращивания МСК костного мозга с использованием АВ (IV) сыворотки крови человека.

2 Полученные по разработанной технологии трансплантаты МСК соответствуют международным критериям качества по содержанию клеток с фенотипом CD90⁺, CD105⁺, CD45⁺, CD34⁺.

3 Установлено достоверное повышение экспрессии генов нейро-специфической енолазы, нестина и ассоциированного с микротрубочками белка 2 в процессе нейроиндукции МСК.

4. Применение аутологичных МСК (внутривенное введение интактных и эндолюмбальное введение нейроиндуцированных) показало безопасность и эффективность метода для терапии фармакорезистентной эпилепсии.

*N. N. Danilkovich**

**APPLICATION OF BONE-MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS FOR
CELL THERAPY OF EPILEPSY**

Tutors: M. D. Ph. D S. M. Kosmacheva,*

Senior lecturer O. S. Nikitina

Department of Normal Physiology,

Belarusian State Medical University, Minsk

**«RSPC for Transfusion and Medical Biotechnology, Minsk*

Литература

1. Опыт применения аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга в лечении пациентов с симптоматической эпилепсией / Ф.П. Хлебоказов, Т.В. Докукина, С.И. Игнатенко и др. // Эпилепсия и параксизмальные состояния. – 2014. – Т.6. - №1. – С. 6-14.
2. Shakhbazau, A. Autologous mesenchymal stromal cells as a therapeutic in ALS and epilepsy patients: treatment modalities and ex vivo neural differentiation / A. Shakhbazau, M. Potapnev // Cytotherapy. – 2016. – 8 (10). – P. 1245-1255.
3. Treatment of refractory epilepsy patients with autologous mesenchymal stem cells reduces seizure frequency: an open label study / F. Hlebokazov, T. Dakukina, S. Ihnatenko and et. al. // Advances in Medical Sciences. – 2017. – 62. – P. 273-279.