

А.В. Гордиевич, Г.Ф. М'Гиль
**ПЕРЕСАДКА АЛЛОГЕННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК ПАЦИЕНТАМ С РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ**

Научный руководитель: ассист. Н.А. Волкова
Кафедра нервных и нейрохирургических болезней
Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

A.V. Gordievich, H.F. M'Guil
**TRANSPLANTATION OF ALLOGENEIC MESENCHYMAL STEM CELLS
PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS**

Tutor: assistant N.A. Volkova
Department of Nervous and Neurosurgical Diseases
Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. В статье рассмотрены возможности пересадки аутологичных и аллогенных мезенхимальных стволовых клеток при рассеянном склерозе. Изложены результаты предварительных исследований пересадки аллогенных мезенхимальных стволовых клеток пациентам с данной патологией. Патогенетические подходы к лечению данного заболевания разработаны в недостаточной степени. В качестве лечения, помимо препаратов, изменяющих течение РС (ПИТРС), предлагается клеточная терапия, основанная на пересадке аллогенных мезенхимальных стволовых клеток (МСК), использовании их иммуномодулирующих свойств, их способности экспрессировать нейрорегуляторные молекулы и увеличивать выживаемость нейрональных клеток, быстрому увеличению клеточной популяции *in vitro*.

Ключевые слова: рассеянный склероз, мезенхимальные стволовые клетки, клеточная терапия, аллогенная пересадка.

Resume. Problems of transplantation of autologous and allogeneic mesenchymal stem cells in multiple sclerosis have been reviewed in this article. The results of preliminary studies of transplantation of allogeneic mesenchymal stem cells into patients with this pathology have been presented in the given article.

Keywords: multiple sclerosis, mesenchymal stem cells, cell-based therapy, allogeneic transplantation.

Актуальность. Рассеянный склероз (РС) – мультифакториальное хроническое прогрессирующее воспалительно-дегенеративное заболевание ЦНС с выраженным воспалительным, миелин- и аксон-дегенеративным компонентами, вовлечением клеток иммунной системы в развитие патологического процесса, возникающее у пациентов с генетической предрасположенностью [1]. РС характеризуется нарушением баланса между регуляторными и потенциально миелин-реактивными клонами Т-лимфоцитов. В мире этим заболеванием страдает более 2,5 млн человек. Заболевание возникает чаще в молодом и среднем возрасте, приводит к инвалидизации лиц трудоспособного возраста через 10-15 лет.

Основной мишенью терапевтических опций у пациентов с РС является воздействие на иммунную систему с целью подавления воспалительного процесса, который приводит к демиелинизации [2]. Использование препаратов, изменяющих клиническое течение РС (ПИТРС), таких как интерфероны (бетаферон, авонекс, ребиф), гла-

тирамера ацетат (копаксон) и др., проводится длительно, связано с большими финансовыми затратами. У 40% пациентов, на фоне терапии ПИТРС отмечается хороший эффект, у 40% - сомнительный результат, 20% пациентов с РС не отвечают на лечение.

В качестве технологии терапии РС рассматривается применение пересадки мезенхимальных стволовых клеток (МСК), так называемая «клеточная терапия» [3]. МСК представляют собой негематопоэтические мультипотентные и самообновляющиеся клетки-предшественники, обладающие способностью дифференцироваться в разные клоны при определенных условиях, иммунологическая привилегированность (выживание в аллогенном окружении) и активный хоуминг, могут быть выделены из различных тканей организма, включая костный мозг и жировую ткань [4,5].

Клинические испытания подтвердили безопасность как аутологичного, так и аллогенного введения МСК [6].

Имеется ряд исследований, в которых изучалась эффективность использования аутологичных МСК, в то время как о применении аллоМСК при РС имеются лишь отдельные сообщения [7].

Цель: на основе изучения иммуномодулирующих свойств аллогенных мезенхимальных стволовых клеток разработать технологию патогенетической терапии пациентов с рассеянным РС с использованием пересадки клеточных культур. Объект исследования — пациенты с РС, которым проводится пересадка аллоМСК. Дизайн клинического исследования – открытое, проспективное, когортное.

Задачи: оценить эффективность однократной, повторной пересадки аллогенных МСК у пациентов с РС на основании клиники, МРТ-диагностики, ОКТ (NEDA 3, NEDA 4, CDI) на протяжении 3-6-9 месяцев.

Материал и методы. Для верификации диагноза «Рассеянный склероз» были использованы критерии McDonald et al. в редакции 2017 года, активность заболевания выставлена по критериям NEDA 3, NEDA 4, CDI. Аллогенные МСК были получены от здоровых доноров и идентифицированы методом проточной цитофлуориметрии. Показания для пересадки: 1.) рецидивно-ремитирующий рассеянный склероз (PPPC), длительностью от 2 до 20 лет; 2.) возраст пациента от 18 до 50 лет; 3.) EDSS от 2 до 5.5 баллов; 4.) прогрессирование процесса в течение 12-18 месяцев (увеличение по шкале EDSS на 0,5 балла, или > 1 активного очага, или > 1 T2 очага). Клинико-демографическая характеристика пациентов представлена в таблице 1.

Табл. 1. Клинико-демографическая характеристика пациентов с РС (n=7).

Параметр	Пациенты с РС
Количество пациентов	7
Пол, ж/м	2/5
Возраст, лет ¹	33±8,1
Длительность заболевания, лет ¹	32,4 ± 6,9
EDSS на этапе скрининга, баллы ²	3,5 [2,5;5,5]
Среднее количество обострений до пересадки МСК ²	1 [2;3]
Период наблюдения за пациентами, месяцы ¹	4,1 ± 2,0
Средняя концентрация вводимых МСК, МСК/кг ¹	74,4 * 106 ± 11,2 * 106

Примечание: ¹ M=тm; ² Me [межквартильный интервал]

Использовались следующие методы исследования:

1. Метод клинического наблюдения с оценкой степени выраженности неврологической симптоматики по шкале EDSS.
2. Метод нейровизуализации (МРТ) головного мозга с контрастированием.
3. Иммунологические исследования.

АллоМСК были выделены по стандартной методике из жировой ткани (ЖТ) здоровых доноров, полученной при проведении операции мультиорганного забора. Все доноры имели отрицательные результаты тестирования на следующие инфекционные агенты: ВИЧ, гепатит В, гепатит С, сифилис. В процессе культивирования клетки исследовали на цитомегаловирус и вирус простого герпеса человека методом ПЦР. Для подтверждения принадлежности клеток к мезенхимальным стволовым была проанализирована экспрессия маркеров клеточной поверхности методом проточной цитофлуориметрии. При подготовке биомедицинского клеточного продукта (БМКП) контроль стерильности проводили на автоматизированном анализаторе VasT/ALERT 3D (Франция) с использованием факультативно-анаэробных сред на основе стриптиказо-соевого бульона.

Результаты и их обсуждение. Проведено совместное культивирование мононуклеаров периферической крови (МПК) пациентов с РС с аллоМСК в условиях митогенной и миелин-специфической стимуляции с последующей оценкой пролиферативного потенциала CD3+Т-лимфоцитов. Установлено, что степень выраженности иммуносупрессивного действия аллоМСК на миелин-индуцированную пролиферацию Т-клеток статистически значимо не отличается по сравнению с аналогичным показателем митоген-стимулированной пролиферации ($k_{pMOG}=31,8 (14,2 \div 47,4)\%$ и $k_{FGA} = 38,5 (30,8 \div 46,5)\%$, соответственно). Для оценки возможности дальнейшего использования биомедицинского клеточного продукта аллогенных МСК (БМКП аллоМСК) *in vitro* для пересадки установлен предел референтного интервала значений коэффициента супрессии аллоМСК ФГА-индуцированной пролиферации Т-клеток ($k \geq 31,2\%$), при которых целесообразно введение аллоМСК пациенту с РС.

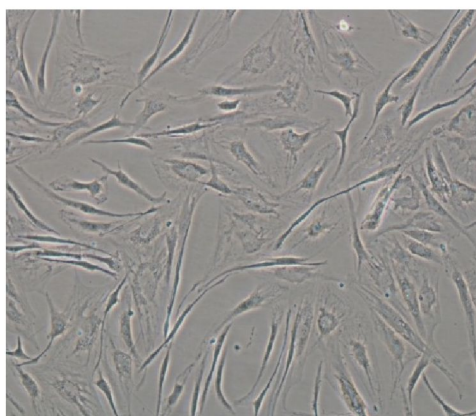
Из Банка МСК, функционирующего на базе ГУ МНПЦ ХТ и Г на основании оценки вышеуказанного коэффициента было отобрано 4 образца МСК, обладающих достаточными иммуносупрессивными свойствами. Характеристика образцов ЖТ, а также количество выделенных клеток представлены в таблице 2.

Табл. 2. Характеристика образцов ЖТ пациентов с РС

№ образца	Объем образца, мл	Количество клеток исходной популяции, $\times 10^6$	Посевная концентрация, $\times 10^3/\text{см}^2$
1	100	151,2	672
2	100	253,2	1125
3	85	115,5	770
4	100	143,0	817

Длительность культивирования первичных культур МСК ЖТ составила 9-11 дней, что соответствует нормальной пролиферативной активности клеток из ЖТ здоровых доноров. Посевная концентрация варьировала от 672 до $1125 \times 10^3/\text{см}^2$. В ходе исследования был проведен морфологический анализ 4 культур МСК ЖТ, полученных от доноров с констатированной смертью мозга.

Культуры МСК ЖТ представляли собой фибробластоподобные клетки, адгезированные к пластику, что соответствует морфологическим характеристикам МСК. В процессе культивирования популяции аллоМСК становились более гомогенными (рисунок 1), что подтверждалось также иммунофенотипически.



А) МСК ЖТ Р1



Б) МСК ЖТ Р3

Рис. 1 – Морфологические изменения МСК ЖТ №2, ФК, $\times 100$

В результате исследования были отобраны культуры МСК с наиболее высокими коэффициентами супрессии антиген-неспецифической пролиферации Т-лимфоцитов ($k \geq 31,2\%$), из которых было подготовлено 3 БМКП с коэффициентами $k=62,6\%$, $k=84,1\%$, $k=76,4\%$. Показатели клеточности составляли соответственно $176,3 \times 10^6$, $167,5 \times 10^6$, $188,5 \times 10^6$.

Полученные аллоМСК были введены путем внутривенной инфузии 7 пациентам с РС. Непосредственно после пересадки аллоМСК и за время наблюдения в раннем посттрансплантационном периоде осложнений не отмечалось. За период наблюдения обострений заболеваний не было. У трёх пациентов из 7 была выполнена повторная пересадка аллогенных МСК, и на данный момент готовятся ещё 3 пациента к первой пересадке.

Выводы:

1. Отсутствие оптимальных протоколов лечения РС, направленных на селективное подавление аутореактивных клонов Т-лимфоцитов и восстановление поврежденных участков ЦНС, обуславливает возрастающий интерес исследователей к использованию МСК для терапии РС. Иммуномодулирующие, тканепротекторные и репаративные свойства МСК были продемонстрированы как *in vitro*, так и *in vivo*, что значительно увеличивает их потенциал в лечении РС и других состояниях, характеризующихся воспалением и/или повреждением тканей.

2. Другие потенциальные преимущества МСК как терапевтического средства включают относительную легкость экспансии культуры, относительную иммунотолерантность, позволяющую аллогенную пересадку, и их способность перемещаться

из крови в другие ткани, что позволяет уменьшить инвазивность пересадки внутри-сосудистым введением.

3. В перспективе может стать эффективным методом лечения РС, уменьшить показатели инвалидизации и улучшить качество жизни пациентам.

Литература

1. Claes N, Fraussen J, Stinissen P, Hupperts R, Somers V. B Cells Are Multifunctional Players in Multiple Sclerosis Pathogenesis: Insights from Therapeutic Interventions. *Front Immunol.* 2015 Dec 21;6:642. doi: 10.3389/fimmu.2015.00642. PMID: 26734009; PMCID: PMC4685142.

2. Зафранская, М. М. Мезенхимальные стволовые клетки: иммуномодулирующие свойства и обоснование их применения для клеточной иммунотерапии рассеянного склероза: дис. ... д-ра мед. наук: 14.03.09 / М. М. Зафранская. – Минск, 2016. – 264 с.

3. Кривенко, С. И., Усс А. Л., Дедюля Н. И. Опыт и перспективы клинического применения мезенхимальных стволовых клеток // Проблемы здоровья и экологии. – 2011. – Прил. № 2. – С. 51–54.

4. da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2008 Sep;26(9):2287-99. doi: 10.1634/stemcells.2007-1122. Epub 2008 Jun 19. PMID: 18566331.

5. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.* 2008 Sep 11;3(3):301-13. doi: 10.1016/j.stem.2008.07.003. PMID: 18786417.

6. Cohen JA. Mesenchymal stem cell transplantation in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2013;333(1-2):43-49. doi:10.1016/j.jns.2012.12.009

7. Федулов, А. С., Борисов А. В., Зафранская М. М., Марченко Л. Н., Кривенко С. И., Качан Т. В., Далидович А. А. Клеточная терапия рассеянного склероза. – Минск: Никтаграфикс Плюс, 2018. – 251 с.