

Получение трансплантата мезенхимальных стволовых клеток костного мозга для клеточной терапии эпилепсии

Данилкович Наталия Николаевна

Белорусский государственный медицинский университет, Минск

Научный(-е) руководитель(-и) Никитина Ольга Сергеевна, Белорусский государственный медицинский университет, Минск

Введение

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.

Цель исследования

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

Материалы и методы

МСК выделяли из фракции моноклеаров костного мозга методом разделения на градиенте плотности фиколл-пак и наращивали в полной питательной среде на основе α -MEM, 2мМ глутамина, 5% сыворотки АВ (IV) и антибиотиков на протяжении 2-3 пассажей. Дифференцировку МСК в нейрогенном направлении проводили в индукционной среде DMEM F12 KnockOut с добавлением Neural Supplement, bFGF, EGF в течение 6 дней. Определяли уровень экспрессии маркеров нейрогенеза методом ПЦР в реальном времени: нейрон-специфическую енолазу (NSE), нестин (NES), ассоциированный с микротрубочками белок 2 (MAP 2) и глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP).

Результаты

Нами разработана технология культивирования МСК в присутствии 5% сыворотки АВ (IV) человека, которая в течение 2-3 пассажей позволяет наращивать $0,5-1,5 \times 10^6$ клеток на кг веса пациента. Клеточность трансплантата для внутривенного введения составила $47,0 - 72,0 \times 10^6$ /клеток, для эндолюмбального введения – $8,0 - 10,0 \times 10^6$ /клеток с жизнеспособностью 98-99%. МСК экспрессировали на своей поверхности CD90+ более 95%, CD105+ более 95%, CD34+ менее 5%, CD45+ менее 5%. Установлено достоверное повышение синтеза мРНК нейро-специфической енолазы, нестина и MAP-2 в культурах нейродифференцированных МСК.

Выводы

Разработана технология наращивания МСК костного мозга на основе использования АВ (IV) сыворотки крови человека в объеме достаточном для клинического применения. Использование комбинированного введения МСК (интактных клеток для внутривенного и нейроиндуцированных для эндолюмбального введения) показало безопасность и перспективность использования аутологичных стловых клеток для терапии пациентов с эпилепсией в Республике Беларусь.