



**Рисунок 3 — Стимуляция синтеза ИЛ-8 в культуре моноцитов крови человека под действием рCXCR2 в присутствии либо отсутствии протеиназы К (а) и гликозидазы F (б). Представлены результаты репрезентативного эксперимента (среднее значение ± SD)**

Таким образом, нами впервые показана способность рCXCR2 стимулировать синтез ИЛ-8 в культуре моноцитов крови и установлено, что как белковая, так и углеводная части рCXCR2 необходимы для проявления этой активности. Это может указывать на наличие биологической активности у рCXCR2 *in vivo* в очаге воспаления и на его роль в реакциях естественного иммунитета, направленную на привлечение нейтрофилов в очаг инфекции и поддержания их активированного состояния.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Выявление и иммунохимическая характеристика растворимой формы рецептора CXCR2 интерлейкина-8 человека / С. Т. Акалович [и др.] // Доклады НАН Беларуси. — 2008. — № 6. — С. 87–92.
2. Васильева, Г. И. Кооперативное взаимодействие моно- и полинуклеарных фагоцитов, опосредованное моно- и нейтрофилокинами доноров / Г. И. Васильева, И. А. Иванова, С. Ю. Тюкавкина // Иммунология. — 2000. — № 5. — С. 11–17.
3. Роль металлопротеиназ в регуляции экспрессии рецептора интерлейкина-8 CXCR2 на нейтрофилах человека / Ю. В. Котлинская [и др.] // Доклады НАН Беларуси. — 2011. — № 3. — С. 83–87.
4. Биохимическая характеристика растворимой формы рецептора CXCR2 интерлейкина-8 человека / К. В. Котлинский [и др.] // Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук. — 2009. — № 2. — С. 85–89.
5. Потаннев, М. П. Цитокиновая сеть нейтрофилов при воспалении / М. П. Потаннев // Иммунология. — 1995. — № 4. — С. 34–40.
6. Akira, S. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR / S. Akira, H. Hemmi // Immunol.Lett. — 2003. — Vol. 85. — P. 85–95.
7. Baggolini, M. Chemokines in pathology and medicine / M. Baggolini // J. Intern. Med. — 2001. — Vol. 250. — P. 91–104.
8. Human neutrophil  $\alpha$ -defensin modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells / Y. V. Chaly [et al.] // Eur. Cytokine Netw. — 2000. — Vol. 11. — P. 257–266.
9. Systemic neutralization of interleukin-8 markedly reduces neutrophilic pleocytosis during experimental lipopolysaccharide-induced meningitis in rabbits / R. A. Dumont [et al.] // Infect. Immun. — 2000. — Vol. 68. — P. 5756–5763.
10. Characterization of conserved viral leader RNA sequences that stimulate innate immunity through TLRs / A. Forsbach [et al.] // Oligonucleotides. — 2007. — Vol. 17. — P. 405–417.
11. A monoclonal antibody and an enzyme immunoassay for human Ala-IL-8(77) / N. N. Nashkevich [et al.] // J. Immunol. Methods. — 2002. — Vol. 270. — P. 37–51.
12. Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1) / T. Yoshimura [et al.] // J. Immunol. — 1987. — Vol. 139. — P. 788–793.

УДК 611.013.395+615.324

### ОПЫТ И ПЕРСПЕКТИВЫ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

С. И. Кривенко, А. Л. Усс, Н. И. Дедюля

9-я городская клиническая больница, г. Минск

Перспективным и уже применяемым в клинической практике в Республике Беларусь направлением клеточной терапии является тандемная трансплантация гемопоэтических и мезенхиальных стволовых клеток (ГСК и МСК) при онкогематологических заболеваниях и рассеянном склерозе. МСК также эффективно используются в качестве сопутствующей иммуносупрессивной терапии при возникновении острой и хронической РТПХ. Протоколы применения МСК для терапии онкогематологических больных и больных рассеянным склерозом утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь. Эффективность клеточной терапии с использованием МСК изучается в клинических исследованиях при лечении различных заболеваний: генетически обусловленных дегенеративных заболеваний скелета, ишемической болезни, цирроза печени, нейродегенеративных заболеваний (паркинсонизм, болезнь Альцгеймера). Экспериментальные работы и клинические испытания показали положительный эффект трансплантации МСК при инфаркте миокарда и заместительной терапии при печеночной недостаточности.

**Ключевые слова:** стволовые клетки, трансплантация мезенхимальных стволовых клеток, реакция «трансплантат против хозяина», рассеянный склероз, кардиомиопластика, заболевания печени.

## EXPERIENCE AND PROSPECTS OF THE CLINICAL APPLICATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS

S. I. Krivenko, A. L. Uss, N. I. Dedyulya

Municipal Clinical Hospital № 9, Minsk

Tandem transplantation of hemopoietic and mesenchymal stem cells is a perspective and now widely used direction of cell therapy of oncohematological diseases and multiple sclerosis in the clinical practice of the Republic of Belarus. Mesenchymal stem cells are also effectively used as concomitant immunosuppressive therapy of acute and chronic reaction Transplant Against Host (RTAH). The protocols of the application of mesenchymal stem cells for the therapy of oncohematological patients and patients with multiple sclerosis are approved by the Ministry of Public Health Care of the Republic of Belarus. The efficacy of the cell therapy with the use of mesenchymal stem cells is studied in the clinical research in the treatment for various diseases: genetic degenerative diseases of skeleton, ischemic disease, liver cirrhosis, neurodegenerative diseases (parkinsonism, Alzheimer's disease). The experimental work and clinical trials have shown the positive effect of the transplantation of mesenchymal stem cells in myocardial infarction and in the substitutive therapy of liver impairment.

**Key words:** stem cells, transplantation of mesenchymal stem cells, reaction «Transplant Against Host», multiple sclerosis, cardiomyoplasty, diseases of liver.

### **Введение**

Расширение знаний о свойствах стволовых клеток, а также развитие медицинских технологий, позволившее выделять и идентифицировать данную клеточную популяцию из тканей организма, обеспечило активное внедрение методов клеточной терапии в трансплантологию, гематологию, регенеративной медицине, фармакологию. Отличительной особенностью стволовых клеток, на которой основано их применение в клинической практике, является их способность к самовозобновлению и к мультилинейной дифференцировке. Между стволовой клеткой и ее терминальным потомством обычно имеется несколько промежуточных клеток с возрастающей способностью к дифференцировке. Стволовые клетки недифференцированы, и в большинстве тканей не способны выполнять специальные функции.

Первоначальные исследования в области клеточной терапии были сконцентрированы на ГСК, трансплантация которых на сегодняшний день является стандартом лечения пациентов с онкогематологическими заболеваниями и аутоиммунной патологией. Отмечается ежегодное увеличение, как количества трансплантаций, так и числа центров, где они выполняются. По данным отчетов Европейской группы трансплантации гемопоэтических клеток крови и костного мозга (EBMT), за последние 15 лет число трансплантаций ГСК возросло с 4 234 до 24 168. В 2010 г. в Республиканском центре трансплантации органов и тканей на базе УЗ «9-я городская клиническая больница выполнено 11 аллогенных и 70 аутологичных трансплантаций ГСК.

В настоящее время в мире для расширения возможностей применения аллогенной трансплантации ГСК активно используются возможности банков стволовых клеток (на сегодняшний день это, в основном, гемопоэтические

клетки из различных источников, в т. ч. из пуповинной крови). В Республике Беларусь на базе 9-й ГКБ организован и функционирует банк пуповинной крови, имеющий в своих фондах более 200 образцов концентрата крови пуповинной-плацентарной, в т. ч. более 60 образцов персонифицированного хранения.

Новым направлением для практического здравоохранения Беларуси стало использование технологии трансплантации аутологичных МСК больным рассеянным склерозом. В Республиканском центре трансплантации органов и тканей уже выполнено более 20 таких пересадок. Первые результаты работы нашего центра позволяют рассчитывать на то, что именно терапия стволовыми клетками даст возможность повысить эффективность лечения и качество жизни данной тяжелой категории больных.

Другим перспективным и уже применяемым в клинической практике в Республике Беларусь направлением является тандемная трансплантация ГСК и МСК при онкогематологических заболеваниях и рассеянном склерозе. Исследование с участием людей демонстрирует, что введение МСК также безопасно, как и введение ГСК [2, 3]. Более того, отсутствие экспрессии HLA-DR и иммуносупрессивные возможности МСК делают эти клетки подходящими для аллогенной трансплантации, снижая риск развития реакции отторжения. МСК из костного мозга и жировой ткани не провоцируют *in vitro* аллореактивность несовместимых лимфоцитов, а также подавляют реакцию в смешанных культурах лимфоцитов и пролиферативный ответ лимфоцитов на митогены [2, 3].

Использование тандемной трансплантации ГСК и МСК основано на способности МСК поддерживать кроветворение, не только увеличивая число примитивных ГСК (преимуще-

ственно миелоидных и мегакариоцитарных предшественников), но и поддерживая их пролиферацию и дифференцировку. К совместной трансплантации ГСК и МСК, как правило, прибегают при недостаточности CD34+ клеток в трансплантате, что сопряжено с высоким риском его неприживления.

МСК также эффективно используются в качестве сопутствующей иммуносупрессивной терапии при возникновении острой и хронической РТПХ, которая является одной из основных причин, ограничивающих успешное проведение аллогенных трансплантаций гемопоэтических клеток.

В Республиканском центре трансплантации органов и тканей в 2010–2011 гг. выполнена 41 трансплантация МСК: 15 аллогенных (в т. ч. 8 от родственного донора и 7 от неродственного донора) и 26 аутологичных. Разработанные специалистами нашего центра протоколы применения МСК для терапии онкогематологических больных и больных рассеянным склерозом утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь.

По мере углубления наших знаний о стволовых клетках открываются новые перспективы для их клинического применения. Плюрипотентность стволовых клеток, их способность к самоподдержанию и миграции в очаг повреждения, а также к смене программ развития и дифференцировки дает им решающие преимущества по сравнению с дифференцированными клетками для применения в регенеративной медицине. Интерес к изучению наделенных высокой пластичностью к адаптивной дифференцировке и репрограммированию гетерогенных МСК (популяции стволовых клеток, из которых происходят специализированные клетки опорных тканей: костной, хрящевой, жировой, эндотелиальной, мышечной, клетки соединительной ткани, а также клетки ретикулярной ткани костного мозга), активно нарастает в последние годы из-за очевидных возможностей их практического применения. Высокий дифференцировочный и пролиферативный потенциал МСК, их низкая иммуногенность, а также относительная легкость в получении и наращивании их *in vitro*, вероятно, позволит этим клеткам конкурировать с эмбриональными стволовыми клетками в решении многих медицинских проблем. Особенно с учетом того, что клиническое применение эмбриональных клеток сопряжено с комплексом трудно решаемых технических и морально-этических последствий в области репродуктивного и терапевтического клонирования.

Эффективность клеточной терапии с использованием МСК изучается в клинических исследованиях при лечении различных заболеваний: генетически обусловленных дегенеративных заболеваний скелета, ишемической бо-

лезни, цирроза печени, нейродегенеративных заболеваний (паркинсонизм, болезнь Альцгеймера). Одним из многообещающих подходов является трансплантация аутологичных МСК больным с ишемической болезнью сердца [3,5] и с заболеваниями печени [1].

Экспериментальные работы и клинические испытания показали положительный эффект трансплантации МСК при инфаркте миокарда [1, 4, 5]. Механизмы действия предположительно связаны с дифференцировкой МСК в кардиомиоциты и, как следствие, с пластической функцией последних, а также с продукцией факторов роста и противовоспалительных цитокинов. Кроме того, МСК оказывают противовоспалительное действие, подавляя иммунные реакции в очаге повреждения.

Для обеспечения заместительной функции трансплантата при кардиомиопластике применение МСК имеет ряд неоспоримых преимуществ перед традиционной органной трансплантацией. Во-первых, доступность клеточной кардиомиопластики на порядок выше трансплантации донорского сердца. Во-вторых, с учетом низкой иммуногенности МСК, снимаются ограничения, обусловленные различиями между фенотипами донора и реципиента. В-третьих, клеточную кардиомиопластику можно многократно повторять. В-четвертых, МСК функционально активны (вырабатывают факторы роста и регенерации). В-пятых, количество МСК у взрослого человека достаточно для относительно быстрого и технологически доступного культивирования [4].

В клинических исследованиях изучается возможность использования МСК для подавления воспалительных процессов, лежащих в основе печеночной недостаточности. В последнее время появились данные о стимуляции регенерации печени методом трансплантации стволовых клеток (гемопоэтических и/или мезенхимальных), которые способны давать начало клеткам печени *in vitro* и *in vivo*. Убедительно показанная на животных дифференцировка МСК в функционирующие гепатоцитоподобные клетки, а также доказанная безопасность введения и отсутствие каких-либо побочных реакций делают МСК наиболее перспективными кандидатами в клеточной терапии заболеваний печени, которая, в ряде случаев, может стать альтернативой органной трансплантации.

Однако наряду с исследованиями по применению клеточной терапии МСК, свидетельствующими о восстановлении как ткани печени, так и ее функции, существуют работы, доказывающие профиброгенный потенциал МСК. Поэтому эффективность введения МСК, например, при циррозе печени, может быть обусловлена улучшением состояния микроокружения и активацией за счет вырабатываемых внеклеточ-

ным матриксом паракринных факторов эндогенных гепатоцитов и их предшественников.

Исследования по применению МСК в терапии пациентов с тяжелой формой печеночной недостаточности, ожидающих трансплантации печени, начаты и в Республиканском центре трансплантации органов и тканей, перспективной задачей которого является расширение применения стволовых клеток для терапии различных состояний, в т. ч. и их применение в органной трансплантологии, а также создание новых стандартов лечения на основе стволовых клеток и активное внедрение этих высокотех-

нологичных методов терапии в практику здравоохранения.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Клеточные технологии при ишемической болезни сердца / А. Б. Смолянинов [и др.] // АГ-инфо. — 2006. — № 2. — С. 6–15.
2. Barry, F. P. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization / F. P. Barry, J. M. Murphy // Int. J. Biochem. Cell. Biol. — 2004. — Vol. 36. — P. 568–584.
3. Gilgenkrantz, H. Mesenchymal stem cells: an alternative source of hepatocytes / H. Gilgenkrantz // Hepatology. — 2004. — Vol. 40. — P. 1256–1259.
4. Anti-inflammation role for mesenchymal stem cells transplantation in myocardial infarction / J. Guo [et al.] // Inflammation. — 2007. — Vol. 30(3–4). — P. 97–104.
5. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation / W. T. Tse [et al.] // Transplantation. — 2003. — Vol. 75. — P. 389–397.

УДК 611.018.26:616-006.3]:615.324

### ТРАНСПЛАНТАТ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ: ПОЛУЧЕНИЕ, СТАНДАРТИЗАЦИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

С. И. Кривенко, Е. А. Назарова, Е. А. Селезнева, А. А. Коритко,  
Н. И. Дедюля, А. Л. Усс, В. В. Смольникова, Е. С. Бузук

9-я городская клиническая больница, г. Минск

В работе определены стандартные условия получения трансплантата мезенхимальных стволовых клеток (МСК) из жировой ткани для клинического применения в качестве котрансплантата при аллогенных пересадках гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Для обеспечения безопасности трансплантата помимо контроля его качества, включающего морфологический и иммунофенотипический анализ, при паспортизации МСК обязательно являлись результаты микробиологических тестов и теста на жизнеспособность. При выдаче МСК жировой ткани (ЖТ) для терапии оформлялся паспорт, разработанный ранее для систематизации сведений о трансплантате. По данному протоколу было подготовлено для клинического применения 19 трансплантатов МСК ЖТ, успешно использованных в качестве ко-трансплантатов при аллогенной пересадке ГСК и в терапии РТПХ у пациентов с онкогематологической патологией в УЗ «9-я городская клиническая больница».

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, жировая ткань, посевная концентрация, иммунофенотип, клеточный трансплантат.

### TRANSPLANT OF MESENCHYMAL STEM CELLS FROM ADIPOSE TISSUE: OBTAINMENT, STANDARTIZATION AND APPLICATION

S. I. Krivenko, E. A. Nazarova, E. A. Selesniova, A. A. Koritko,  
N. I. Dedyulya, A. L. Uss, V. V. Smolnikova, E. S. Buzuk

Municipal Clinical Hospital № 9, Minsk

The work determines the standard conditions for the obtainment of a transplant of mesenchymal stem cells from adipose tissue for the clinical application as co-transplant in allogenic transplantation of hemopoietic stem cells. To ensure the safety of the transplant besides its quality control, including morphologic and immunophenotypic tests, the results of microbiological tests and viability test were necessary in the categorization of mesenchymal stem cells. The registration certificate, devised earlier for the systematization of data on the transplant was drawn, when the mesenchymal stem cells from adipose tissue were distributed for the therapy. Nineteen transplants of the mesenchymal stem cells from the adipose tissue were prepared by this protocol for the clinical application. They were successfully used as co-transplants in the allogenic transplantation of hemopoietic stem cells and in the therapy of reaction Transplant Against Host in patients with oncohematological pathology in Minsk Municipal Clinical Hospital No.9.

Key words: mesenchymal stem cells, adipose tissue, inoculation concentration, immunophenotype, cell transplant.

МСК являются наиболее перспективным агентом для использования в клеточной терапии. Это связано с относительной простотой культивирования этой популяции стволовых клеток, с их

плюрипотентностью, способностью к самоподдержанию, высоким пролиферативным потенциалом, а также с низкой иммуногенностью и иммуносупрессивными свойствами [3, 4, 5]. МСК спо-