

УДК 616.12

В.А. Нятыков, С.Ю. Масловский, Е.А. Шогельская  
Харьковский национальный медицинский университет, Харьковский национальный университет им.  
В.Н. Каразина

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕЙРОИНДУЦИРОВАННЫХ СТРОМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ АУТОКЛЕТОК В ЛЕЧЕНИИ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА

Стромальные клетки костного мозга человека (СККМ), индуцированные *in vitro* под действием ретиноевой кислоты, были использованы для введения при лечении больных болезнью Паркинсона (БП). В ближайший послеоперационный период у больных отмечался регресс тремора, снижение ригидности, подъем содержания дофамина в крови. Показано, что интрацеребральные введения нейробластов более эффективны, чем эндолумбальные при лечении больных с джрательно-ригидной и акинетико-ригидной формамию

**Ключевые слова:** стромальные клетки костного мозга, нейробласты, болезнь Паркинсона

Болезнь Паркинсона — распространенное нейродегенеративное заболевание, причиной которого является снижение функции или дегенерация дофаминергических нейронов, расположенных в substantia nigra [1, 6]. Известны попытки восстановления популяции этих нейронов путем пересадки фетальных нервных клеток, а также хромаффинных клеток коры надпочечников. В обоих случаях иногда наблюдался кратковременный положительный эффект. Однако из-за использования чужеродного материала трансплантация фетальных тканей часто сопровождалась осложнениями, а также запрещена во многих странах мира по этическим причинам.

Новым источником нервных клеток для лечения нейродегенеративных заболеваний могут стать плюрипотентные аутологичные стволовые клетки стромы костного мозга (АСККМ), которые дифференцируются в культуре в нервные клетки под действием разных индукторов. Американские ученые впервые в 2000 г. показали возможность дифференцировки *in vivo* СККМ крыс и человека в нервные клетки под действием 3-меркаптозанола и диметилсульфоксида [5]. В других работах была показана возможность нейроиндукции СККМ человека и крыс под действием некоторых ростовых факторов (EGF, BMP), ретиноевой кислоты [4], изобутилметилксантина и циклического АМФ.

В нашей лаборатории также были получены результаты дифференцировки *in vitro* СККМ мыши в клетки нервной ткани под действием ретиноевой кислоты и специфической кондиционной среды. В дифференцирующихся нервных клетках были выявлены нейронспецифические белки:  $\beta$ -тубулин и нейрофиламент-М [2].

Результаты исследований на крысах свидетельствуют о репарирующей роли клеток стромы костного мозга при повреждениях головного и спинного мозга крыс. СККМ участвуют в репарации участков нервной ткани, дифференцируясь в зоне повреждения в нейроны и клетки глии, что способствует восстановлению утраченных двигательных функций [3,5, 7].

**Целью работы** было изучение индукции *in vitro* СККМ человека в нейробласты и обоснование целесообразности введения этих клеток при лечении пациентов с болезнью Паркинсона (БП).

**Материал и методы исследования.** 1. *Культивирование стромальных клеток костного мозг.* Кусочек губчатой кости с костным мозгом размером 1 см<sup>3</sup> извлекали из подвздошной кости пациента и транспортировали в лабораторию в физиологическом растворе при температуре 0 °С. Суспензию костного мозга помещали в раствор Хенкса и отмывали в нем центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в среде MEM/P12 с 20% фетальной бычьей сывороткой и 50 мкг/мл гентамицина. Клетки рассеивали в культуральные флаконы площадью 80 см<sup>2</sup>. Через 24 ч культивирования среду сливали, а клетки дважды промывали раствором Хенкса. К прикрепленным ко дну флакона клеткам добавляли свежую культуральную среду и культивировали стромальные клетки при температуре 37°С и 5% CO<sub>2</sub> в течение 14 суток до образования клеточного монослоя.

2. *Индукция стромальных клеток в нервные клетки.* Для индукции дифференцировки нервных клеток использовали первичные культуры СККМ, которые снимали с поверхности культурального флакона после кратковременной инкубации в 0,25% растворе трипсина. Отмытые от трипсина клетки переносили в индукционную среду, состоящую из раствора Хенкса, 2% сыворотки крови пациента и 10<sup>-6</sup>М ретиноевой кислоты. Стромальные клетки инкубировали в этой среде в течение 1,5-2 ч при температуре 37°С. Пациенту вводили (0,7-1,5)х10<sup>6</sup> клеток в растворе хлористого натрия 0,9% и 2% сыворотки крови. Жизнеспособность клеточной суспензии составляла не менее 92%.

3. *Клинические наблюдения.* Под нашим наблюдением находилось 108 больных с БП. По формам заболевания больные распределены следующим образом (рис. 1.).

Больные были информированы о методах культивирования, индукции и способе введения СККМ. Клетки вводили интрацеребрально в субталамическую область (STh), супранигрально, интрацеребрально в сочетании с криодеструкцией и эндолумбально. Катамнез наблюдений составлял от 3 месяцев до 5 лет. Проведено тщательное клинико-неврологическое обследование всех больных.

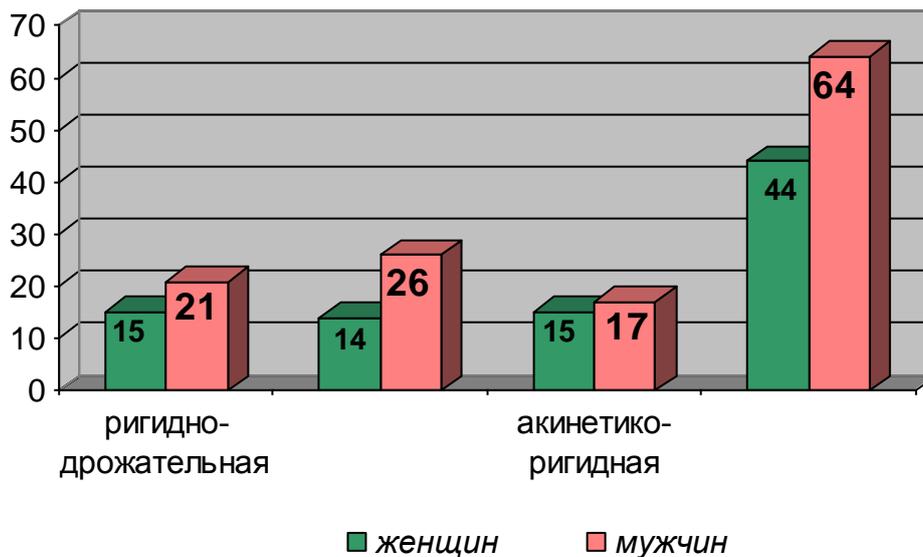


Рис. 1. Распределение больных по формам паркинсонизма и полу.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Стволовые клетки стромы костного мозга человека обладают адгезией к пластику культуральных флаконов и могут быть выделены из суспензии клеток костного мозга и размножены *in vitro*. В результате многократного деления каждая клетка образует колонию, состоящую из фибробластоподобных клеток. Наша методика позволяет получить через 2 недели культивирования 6-8 млн клеток, часть которых может быть использована для лечения пациента, а другая часть законсервирована для длительного хранения в жидком азоте. СККМ неонкогенны, так как имеют ограниченный пролиферативный потенциал и прекращают активно делиться в культуре после 6-7 пассажей. Мы показали, что через 2 ч после индукции в среде с ретиноевой кислотой 30-40% стромальных клеток экспрессируют нестин — маркер нервных стволовых клеток (нейробластов). Индуцированные СККМ приобретают при продолжительном культивировании характерный для нервных клеток фенотип с быстрорастущими за счет конусов роста нейритами. В культуре можно различить биполярные и мультиполярные нервные клетки с ветвящимися дендритами. Некоторые из них начинают устанавливать межклеточные контакты. Показаниями для нейрохирургических вмешательств у больных БП были отсутствие эффекта от приема противопаркинсонических средств (ППС) и прогрессивное течение заболевания.

Наиболее выраженный интра- и послеоперационный эффект в виде полного прекращения тремора и нормализации мышечного тонуса отмечен у больных дрожательно-ригидной и ригидно-дрожательной формами БП, которым было проведено комбинированное стереотаксическое вмешательство на базальных ганглиях головного мозга, включающее криодеструкцию вентролатерального ядра зрительного бугра (VLTh) и введение СККМ, индуцированных в нейробласты, в субталамическую область супранигрально (Sth). Нормализация мышечного тонуса и регресс тремора у этих больных наступали после первого этапа операции — криодеструкции. У больных, которым было проведено изолированное введение СККМ, также отмечен интраоперационный эффект в виде уменьшения тремора и снижения ригидности. Однако наблюдаемый эффект был кратковременным — около 2-3 дней, и его можно объяснить механическим воздействием на субталамическую область, которое, по данным Э.И. Канделя (1981) [8], может привести также к временной блокаде патологических нигростриальных связей, что клинически проявляется частичным или полным прекращением тремора в контралатеральных конечностях.

В настоящей работе основной интерес представляет анализ результатов изолированного введения нейробластов, полученных из СККМ, поскольку оценить влияние этих клеток при комбинированном воздействии возможно лишь при анализе клинической картины заболевания в более позднем, чем 14 месяцев, послеоперационном периоде. Больным с акинетико-ригидной формой (32 больных) проводили эндолумбальное введение нейроиндуцированных СККМ в количестве  $1 \times 10^6$  клеток и объеме 1,0 мл собственного ликвора и 2% сыворотки крови больного. Спустя 4-6 недель 68% (22 пациента) больных отмечали эффект в виде уменьшения ригидности и увеличения объема активных движений на фоне приема ППС.

Эндолумбальное введение нейроиндуцированных аутоклеток комбинировали с внутривенным введением не индуцированных СККМ в количестве  $3 \times 10^6$  клеток и объеме 3,0 мл, разведенных в 50,0 мл физраствора. Динамическое наблюдение за больными этой группы показало постепенное увеличение положительного влияния клеточной терапии в виде дальнейшего увеличения объема активных движений, значительного снижения ригидности и уменьшения дозировки ППС. Остальные больные с акинетико-ригидной формой П (32% - 10 больных) эффекта от проводимой терапии не отмечали. Этим больным были проведены

стереотаксические операции введения нейроиндуцированных СККМ в субталамическую область, 4 из них были проведены двусторонние вмешательства с интервалом в 6 месяцев. После одностороннего введения аутоклеток у 4-х больных этой группы был выраженный эффект в виде нормализации мышечного тонуса в контралатеральных конечностях, значительного увеличения объема активных движений в них и уменьшение дозировки ИПС. После двусторонних вмешательств у 3-х больных отмечен нормальный мышечный тонус во всех конечностях, который мы наблюдаем в течение 5 лет.

#### Выводы

1. Стромальные клетки костного мозга человека могут быть индуцированы *in vitro* под действием ретиноевой кислоты в нейробласты, экспрессирующие нестин.
2. Результаты клинических наблюдений свидетельствуют о том, что интрацеребральное и эндолумбальное введения СККМ, индуцированных в нейробласты, эффективны при лечении больных с акинетико-ригидной формой БП.
3. Использование собственных клеток стромы костного мозга в клеточной терапии больных П исключает проблемы иммунологической несо-вместимости тканей, инфицирование чужеродными вирусами и не вызывает осложнений.

#### Література

1. Пятикоп В.А. Сравнительная оценка комбинированной и изолированной нейротрансплантации у больных болезнью Паркинсона / Пятикоп В.А., Кочин О.В. // Материалы III съезда нейрохирургов Украины, Алушта, 23-25 сентября 2003 г. - С. 198.
2. Щегельская Е.А. Индуцированная дифференцировка клеток стромы костного мозга мыши в нервные клетки. /Щегельская Е.А., Микулинский Ю.Е., Ревущин А.В., Омельченко Е.А.-// Цитология, 2002. - Т.44, №7. - С. 637-641.
3. Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells / A. Mahmood, D. Lu, I. Wang [et al.] // J. Neurosurgery. — 2001. — Vol. 94, N. 5. — P. 11960—2003.
4. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro / J. Sanchez-Ramos, S. Song, F. Cardozo-Pelaez [et al.] // Exp. Neurol. — 2000. — Vol. 164. — P. 247—256.
5. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons / D. Woodbury, T. J. Schwarz, D. J. Prockop, I. B. Black // J. Neurosci. Res. — 2000. — Vol. 61, N. 4. — P. 364—370.
6. Биология стволовых клеток и клеточные технологии. //Под редакцией академика РАН и РАМН М.А. Пальцева в двух томах. – Москва, «Медицина» «Шико». – 2009. – 726 с.
7. Нейрогенная дифференцировка стволовых клеток //Под ред. акад. АМН Украины Зозули Ю.А., проф. Лисяного Н.И. - Киев. - 2005. - 365с.
8. Кандель Э. И. Функциональная и стереотаксическая нейрохирургия / Э. И. Кандель. — М. : Медицина, 1981. — 367, [1] с.

#### Резюме

### ВИКОРИСТАННЯ НЕЙРОІНДУКОВАНИХ СТРОМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ АУТОКЛІТИН В ЛІКУВАННІ ХВОРИХ НА ХВОРОБУ ПАРКІНСОНА

П’ятикоп В.А., Масловський С.Ю., Щегельська Е.А.

Стромальні клітини кісткового мозку людини, індуковані *in vitro* в нейробласти під дією ретиноевої кислоти, були використані для аутотрансплантації при лікуванні восьми пацієнтів з хворобою Паркінсона. У найближчий післяопераційний період у хворих спостерігали регрес тремору, зниження ригідності, підвищення рівня дофаміну в крові. Показано, що інтрацеребральні трансплантації нейробластів більш ефективні, ніж ендолумбальні, при лікуванні хворих з тремтливо-ригідною та акинетико-ригідною формами ХП.

Ключові слова: стромальні клітини кісткового мозку, нейробласти, хвороба Паркінсона.

Стаття надійшла 24.02.2011 р.

### THE APPLICATION OF NEUROINDUCED STROMAL STEM CELLS IN TREATMENT OF PATIENTS WITH PARKINSON DISEASE Pyatikop V., Maslovskiy S., Schegelska E.

Human bone marrow stromal cells were induced *in vitro* into neuroblasts with rethinoic acid and injected to patients with Parkinson’s disease. Tremor regression, rigidity decrease and rising of dopamine level in liquor were observed during early period after operations. It was shown that intracerebral neuroblast injection is more effective than endolumbarl one in treatment of patients with tremble-rigid and akinetico-rigid forms of Parkinson’s disease.

Key words: bone marrow stromal cells, neuroblasts, Parkinson’s disease.