

Опыт использования модельного аутоиммунного демиелинизирующего процесса для изучения эффективности лечебного применения эмбриональных и фетальных клеток

Н.И. ЛИСЯНЫЙ, О.В. МАРКОВА, В.И. ШЫМБАЛЮК, Л.Н. БЕЛЬСКАЯ, Л.Д. ПИЧКУР, В.М. СЕМЕНОВА,
А.Т. НОСОВ, В.В. ВАСЛОВИЧ, И.А. ВОТЯКОВА, С.В. ВАСИЛОВСКАЯ
Институт нейрохирургии имени акад. А.П. Ромоданова АМН Украины, г. Киев

Экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ) традиционно используется при разработке новых методов лечения демиелинизирующих заболеваний человека. В основе патогенеза ЭАЭ лежит аутоиммунное воспаление в мишеневом органе (ЦНС), которое сопровождается демиелинизацией аксонов и соответствует по своим гистологическим и электронно-микроскопическим признакам патологическим изменениям в нервной системе при рассеянном склерозе. Использование ЭАЭ в качестве модельного процесса может быть очень информативным при оценке эффективности применения эмбриональных, фетальных и стволовых клеток (СК) [2, 5, 6, 9], однако требует определенного уровня теоретической подготовки, особенно на этапе планирования научного исследования. Следует учитывать, что предупреждение и супрессия ЭАЭ в большей степени связаны с воздействиями на иммунологические механизмы развития заболевания, а лечение заболевающих и уже парализованных животных может быть обусловлено еще и другими факторами (нейропротекция, противоотечное действие, трофические эффекты, заместительное действие и др.). В зависимости от предполагаемого механизма действия препарата выбирается способ его введения (системный, внутрижелудочковый, внутримозговой), кратность введения, формируется протокол наблюдения за животными, определяются сроки забоя (например, для изучения воздействий на процессы ремиелинизации аксонов материал для исследования рекомендуют забирать через 2,5-3 мес. после лечения, а для оценки противовоспалительных эффектов его целесообразно исследовать в ранние сроки после лечения), утверждается схема иммунологического обследования животных и т.д.

Существующие методы клеточной терапии аутоиммунных заболеваний связаны, преимущественно, с попытками воздействия на агрессивный аутоиммунитет (иммуносупрессивная терапия с трансплантацией костного мозга, высокодозовая иммуносупрессирующая терапия с применением

гемопоэтических СК, метод “реставрации” гемопоэза при аутоиммунной гемолитической анемии и адьювантном артрите, метод “переинсталляции” собственной кроветворной ткани [2, 3, 13]. Современным этапом развития клеточной терапии демиелинизирующих заболеваний ЦНС считают использование эмбриональных и фетальных клеток нервной системы, нейральных стволовых клеток, гемопоэтических и мезенхимальных СК, прошедших нейрогенную дифференцировку [1; 7; 9; 10].

Цель исследования – изучение лечебного действия при ЭАЭ полученных различными методами клеток головного мозга и печени аллогенных плодов и эмбрионов.

Материалы и методы

Исследования проведены на 270 нелинейных белых крысах массой 180-200 г. ЭАЭ индуцировали гомогенатом спинного мозга с полным адьювантом Фрейнда [5]. Фетальные и эмбриональные клетки головного мозга и печени вводили внутривентрикулярно (5-6 млн. клеток на 12-е, 14-е и 16-е сутки после индукции ЭАЭ), внутримозговой инъекцией через крышу черепа правого полушария (1 млн. клеток, однократно на 5-е или 15-е сутки после индукции ЭАЭ), эндолюмбально (2 млн криоконсервированных или свежесыводенных клеток, однократно на 16-е сутки после индукции ЭАЭ). Наблюдение за клиническим течением заболевания осуществляли с учетом нескольких критериев и оценивали в баллах [5]. Клинические наблюдения за животными проводили ежедневно на протяжении 1 месяца. Для каждого животного отдельно определяли степень тяжести заболевания с учетом разработанных критериев, животные имели индивидуальные метки, вели индивидуальные протоколы для каждого животного, что позволяло затем детально описывать течение ЭАЭ с учетом различных факторов.

Источником эмбрионального и фетального материала были головной мозг и печень 18-суточных плодов (48 животных), 10-суточных плодов (10 животных) и 35 новорожденных односуточных крыс.

Исследовали клеточные суспензии с различным содержанием нейральных и гемопоэтических СК –

Адрес для корреспонденции: Лисяный Н.И., Институт нейрохирургии имени акад. А.П. Ромоданова АМН Украины, г. Киев; e-mail: alla@neuro.kiev.ua

суспензии клеток головного мозга и печени новорожденных животных, не прошедшие процедуры обогащения; суспензию клеток головного мозга новорожденных крыс, обогащенную клетками с признаками нейральных СК; суспензии нейральных и гемопоэтических клеток-предшественников 18-суточного плода, полученные в условиях длительного культивирования, суспензии криоконсервированных клеток 18-ти суточного плода крысы; суспензии свежевыделенных клеток головного мозга 18-ти суточного плода крысы, обогащенную не прилипающими к пластику клетками; суспензию свежевыделенных клеток головного мозга 18-ти суточного плода крысы, обогащенную прилипающими к пластику клетками; суспензию свежевыделенных клеток головного мозга 10-ти суточного плода крысы. Клетки получали, как описано нами ранее [5, 6, 7, 9]. Для обогащения суспензии клеток головного мозга новорожденных крыс нейральными СК мы использовали их биологические особенности, описанные в ряде работ и обзорных статей [7; 8]. Известно, что нейральные СК не обладают адгезией к пластику, при культивировании в бессывороточной среде они остаются в суспензии нейробластов, где в дальнейшем формируют “нейросферы” [8].

Для получения суспензии нейральных клеток-предшественников плода в условиях длительного культивирования клетки головного мозга культивировали в бессывороточной среде ДМЕМ 4 суток, после чего вносили полную среду ДМЕМ, содержащую ретиноевую кислоту согласно методу [15] и продолжали культивирование. На 8-е от начала культивирования сутки готовили суспензии с конечной концентрацией клеток 1×10^7 в 1 мл. Затем проводили внутримозговую инъекцию 1×10^6 клеток в правое полушарие крыс с ЭАЭ, прокалывая иглой крышу черепа.

Для получения суспензии гемопоэтических клеток-предшественников плода в условиях длительного культивирования клетки печени после 4 сут. культивирования в бессывороточной среде, переносили в полную среду ДМЕМ, содержащую ретиноевую кислоту (конечная концентрация ретиноевой кислоты составляла 2×10^6 М) [12]. На 8-е от начала культивирования сутки готовили суспензии с конечной концентрацией клеток 1×10^7 в 1 мл. Затем проводили внутримозговую инъекцию 1×10^6 клеток в правое полушарие крыс с ЭАЭ, прокалывая иглой крышу черепа.

Криоконсервированные клетки 18-ти суточного плода крыс получали совместно с сотрудниками Центра клеточной и тканевой терапии “Эмбриотек” канд. мед. н. И.А. Вотяковой и науч.сотр. С.В. Василевской.

Результаты и обсуждение

В наших исследованиях апробировались как системное введение клеток (внутрибрюшинно), так и непосредственное введение в желудочек или в мозговое вещество. Целесообразность системного введения аргументировали работами ряда авторов, которые указывали на уникальные свойства СК, их способность преодолевать сосудистую стенку и гистогематические барьеры, в том числе и гемато-энцефалический барьер, находить очаги деструкции ткани в организме и давать лечебный эффект (потенцировать регенерацию ткани через этапы собственной пролиферации и миелинообразование или трансдифференцировки под влиянием факторов локального микроокружения. Кроме того, учитывалась возможность противовоспалительного и иммуностропного действия этих клеток. Непосредственная трансплантация клеток головного мозга или печени (после длительного культивирования *in vitro*) в желудочек или в паренхиму ЦНС головного мозга теоретически позволяла сконцентрировать лечебный эффект клеток в месте тканевой деструкции, избежать потерь, создавать благоприятные условия для быстрой пролиферации или трансдифференцировки за счет специфического микроокружения, обеспечить регионарный лечебный эффект и усилить его [9, 10, 14].

В наших исследованиях трехкратное внутрибрюшинное введение исходной суспензии клеток головного мозга новорожденных крыс животным с ЭАЭ не сопровождалось существенным изменением тяжести клинического состояния крыс относительно состояния животных группы сравнения. Введение исходной суспензии клеток печени новорожденных животных в период проведения лечения (12-16-е сутки) замедлило нарастание тяжести клинических проявлений, однако после прекращения инъекций довольно быстро наступило утяжеление клинического состояния и в дальнейшем ЭАЭ развивался как и у животных группы сравнения. В другой серии опытов после начала трехкратного внутрибрюшинного введения не прилипающих к пластику клеток головного мозга новорожденных крыс нарастание степени тяжести ЭАЭ прекратилось, клиническое состояние крыс стабилизировалось, были обнаружены гистологические признаки стихания воспалительного процесса в ткани спинного мозга. У животных группы сравнения в эти сроки (15-22 сутки после индукции ЭАЭ) развивался пик клинических проявлений энцефаломиелита, 40% животных переносили паралитическую форму ЭАЭ (степень тяжести 3 балла). Интересно, что внутрибрюшинное введение прилипающих к пластику клеток

суспензии головного мозга новорожденных животных (глиобластов, астроцитов, периваскулярных макрофагов и микроглиальных клеток) не облегчает тяжести течения ЭАЭ и замедляет выздоровление животных.

Анализируя результаты проведенных экспериментов, можно прийти к выводу, что наиболее эффективные результаты были получены в серии опытов, где животным вводили обогащенные СК суспензии – не прилипающие к пластику клетки головного мозга и клетки печени новорожденных крыс. Мы провели исследования с использованием клеток головного мозга и печени 18-суточных плодов, из которых путем длительного культивирования в среде ДМЕМ, содержащей ретиноевую кислоту, получали суспензию, обогащенную клетками-предшественниками (предположительно, СК). Эти суспензии мы вводили внутримозговой инъекцией в правое полушарие головного мозга крысам с ЭАЭ.

Сначала мы провели серию экспериментов, когда клетки плода после длительного культивирования в условиях *in vitro* вводили крысам в период развития пика клинических проявлений (15-е сутки после индукции ЭАЭ). Такое лечение не сопровождалось изменением состояния крыс с ЭАЭ по сравнению с животными, которые не получали лечения. Аналогичные результаты получены при использовании клеток печени 18-суточного плода после длительного культивирования в питательной среде). По-видимому, СК, попадая в паренхиму ЦНС в период выраженных явлений воспаления, тканевой деструкции, инфильтрации ткани ЦНС иммунокомпетентными клетками, которые продуцируют цитокины, не оказывают противовоспалительный эффект в такой степени, чтобы его можно было заметить при наблюдении за животными с ЭАЭ. Возможно, что роль СК в данной ситуации в большей степени связана с нейропротекторным действием и потенцированием процессов ремиелинизации. В другой серии экспериментов мы вводили клетки плода после длительного культивирования в условиях *in vitro* на 5-е сутки после индукции ЭАЭ у крыс. В этот срок в головном мозге нет еще явлений аутоиммунного воспаления, продукции провоспалительных цитокинов, в частности продукции фактора некроза опухоли-альфа, нет демиелинизации. Мы предполагали, что такая схема лечения позволит заранее пополнить количество СК в ЦНС и повлияет на развитие клинической картины ЭАЭ. В этой серии у леченных животных тяжесть ЭАЭ в период пика клинических проявлений была ниже, чем у животных группы сравнения, однако мы наблюдали

затем некоторое замедление восстановления двигательных функций животных. Подобную картину мы наблюдали после использования клеток печени 18-суточного плода, прошедших этап длительного культивирования в среде ДМЕМ с добавлением ретиноевой кислоты. Исходя из наших результатов складывается мнение о целесообразности применения обогащенных популяций нейтральных и гемопоэтических СК для лечения и снижения частоты рецидивов у животных с ЭАЭ.

В настоящее время разрабатываются методы введения клеточного материала в ликворные пространства [9]. После такой трансплантации донорские клетки могут мигрировать в различные области ЦНС и интегрироваться в ткань нервной системы. Нами проведены серии экспериментов, в которых криоконсервированные и свежее выделенные клетки головного мозга 18-ти суточных плодов вводились эндолумбально. Этот метод лечения не сопровождался быстрым улучшением клинического состояния животных, тяжесть ЭАЭ даже несколько усиливалась в первые несколько суток после лечения. Гистологических признаков стихания воспаления в ткани ЦНС в ранние сроки после операции также не наблюдалось. Однако, получены электронно-микроскопические данные о достоверном усилении процессов ремиелинизации аксонов в отдаленном периоде (через 2,5 мес).

Следует отметить, что в наших исследованиях системное, внутримозговое и эндолумбальное применение эмбриональных и фетальных клеток у животных с ЭАЭ сопровождалось изменениями показателей функциональной активности клеток иммунной системы (активацией цитотоксических клеток в тесте с ксеногенными эритроцитами и фагоцитирующих клеток селезенки в НСТ-тесте, изменением пролиферативной активности лимфоцитов), изменением удельного веса кортизол-резистентных лимфоцитов селезенки и уровня циркулирующих иммунных комплексов. В целом эти изменения можно считать результатом цитокиновых воздействий, источником которых могут быть эмбриональные и фетальные клетки. По-видимому, именно потенцированием функций фагоцитирующих клеток и клеток естественных киллеров можно объяснить противовоспалительный и иммунорегуляторный эффект клеточных методов терапии ЭАЭ.

Таким образом, проведенные нами исследования позволяют считать, что ЭАЭ крыс представляет собой удобную модель для изучения эффективности применения эмбриональных, фетальных и стволовых клеток. ЭАЭ позволяет оценивать различные по механизму действия эффекты клеточной терапии – противовоспалительный

тельное и иммунорегуляторное действие, влияние на интенсивность агрессивного аутоиммунитета, потенцирование процессов ремиелинизации аксонов, активацию пролиферации олигодендроглиальных предшественников и т.д. Проведенные нами исследования свидетельствуют о том, что наиболее эффективны при ЭАЭ были методы, в которых использовались суспензии, обогащенные СК. Эти наблюдения наводят на мысль о том, что и противовоспалительные, и иммунорегулирующие, и потенцирующие ремиелинизацию механизмы обусловлены уникальным и разносторонним потенциалом именно СК. По-видимому, использование обогащенных СК клеточных фракций станет следующим этапом развития клеточной терапии демиелинизирующих заболеваний ЦНС.

Выводы

1. ЭАЭ является удобной моделью для изучения эффективности лечебного применения эмбриональных и фетальных клеток.

2. Обогащение клеточных суспензий стволовыми клетками улучшает результаты лечения ЭАЭ при системном, внутрижелудочковом и при внутримозговом введении.

3. Внутрижелудочковое и внутримозговое введение эмбриональных и фетальных клеток мало влияет на тяжесть течения ЭАЭ в остром периоде, однако сопровождается усилением процессов ремиелинизации аксонов.

4. Сроки и способ введения клеточных суспензий животным с ЭАЭ могут определять механизм их действия (системное введение в ранние сроки сопровождается преимущественно противовоспалительным и иммунотропным действием, внутримозговое и внутрижелудочковое введение – заместительным и, в меньшей степени, иммунотропным эффектом).

Литература

1. Волошина Н.П., Васильевский В.В., Микулинский Ю.Е., Щегельская Е.А. Аутотерапия клетками стромы костного мозга, индуцированными в нервные, у больных с хроническими заболеваниями ЦНС (рассеянный склероз, болезнь Паркинсона) // Укр. нейрохірург. журн.– 2003.– №3.– С. 61-67.
2. Гольцев А.М., Бабенко Н.М., Останкова Л.В. та ін. Застосування кріоконсервованих продуктів ембріофетоплацентарного комплексу як коректорів аутоімунних захворювань на моделі експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ) // Трансплантологія.– 2003.– Т. 4.– №1.– С. 207-209.
3. Кухарчук А.Л., Радченко В.В., Сирман В.М. Експериментальне обґрунтування способу переінсталяції системи контролю антигенного гомеостазу організму ссавців (ефект Кухарчука-Радченка-Сирмана) // Трансплантологія.– 2002.– Т. 3.– №2.– С. 5-19.

4. Лисяний Н.И. Иммунология и иммунотерапия рассеянного склероза.– Киев, 2003.– 251 с.
5. Лисяний М.І., Маркова О.В., Бельська Л.М. Моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту у щурів і його корекція клітинами алогенного головного мозку // Фізіол. журн.– 2001.– Т. 47.– №5.– С. 37-41.
6. Лисяний Н.И., Маркова О.В. Коррекция аутоиммунного демиелинизирующего процесса у крыс клетками аллогенного головного мозга новорожденных животных // Иммунология.– 2003.– №1.– С.15-19.
7. Нейрогенная дифференцировка стволовых клеток / Под ред. Ю.А. Зозули, Н.И. Лисяного.– Киев, 2005.– 364 с.
8. Сухих Г.Т., Малайцев В.В. Нейральная стволовая клетка – биология и перспективы нейротрансплантации // Бюлл. эксп. биол. и мед.– 2001.– Т. 131, №3.– С. 244-255.
9. Цимбалюк В.І., Лисяний М.І., Маркова О.В. та ін. Результати хірургічного лікування експериментального алергічного енцефаломієліту // Трансплантологія.– 2003.– Т. 4, №1.– С. 115-117.
10. Цимбалюк В., Медведєв В. Стволовые клетки нервной ткани – надежда современной неврологии и нейрохирургии // Doctor.– 2004.– №4.– С. 9-13.
11. Шевченко Ю.Л., Новик А.А., Лядов К.В. и др. Концепция высокодозной терапии с трансплантацией стволовых клеток при аутоиммунных заболеваниях нервной системы // Невролог. журнал.– 2004.– №3.– С. 44-47.
12. Щегельская Е.А., Микулинский Ю.Е., Ревущин А.В. и др. Индуцированная дифференцировка клеток стромы костного мозга мыши в нервные клетки // Цитология.– 2002.– Т. 44, №7.– С. 637-642.
13. Brooks P.M. Hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune disease // Rheumatol. Suppl.– 1997.– Vol. 48.– P. 19-22.
14. Liu S., Qu Y., Stewart N.J. et al. Embryonic stem cells differentiation into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.– 2000.– Vol. 97, N11.– P. 6126-6131.