

УДК 616.831-005.1+616.8-003.8]-089.843:612.419.014.2

## Получение нейробластов из клеток стромы костного мозга и их клиническое применение при некоторых заболеваниях нервной системы

*Яворская В.А., Волошина Н.П., Хвистюк В.В., Гребенюк А.В.,  
Гаврюшин А.Ю., Грецьких К.В., Пелехова О.Л., Микулинский Ю.Е.,  
Василовский В.В., Шестопалова Л.Ф., Щегельская Е.А.*

**Харьковская медицинская академия последипломного образования,  
Институт неврологии, психиатрии и наркологии АМН Украины, г.Харьков**

Показана возможность дифференцировки *in vitro* клеток стромы костного мозга (КСКМ) в клетки-предшественники нервной ткани при культивировании в специфических кондиционных средах и при добавлении в среду некоторых индукторов.

В экспериментальных моделях ишемии на мышах показано, что репаративные процессы на тканевом уровне более активно протекали у лабораторных животных, которым вводились КСКМ, индуцированные в нейральные.

Проведен анализ клинической эффективности аутотрансплантации КСКМ, индуцированных в нейральные клетки у пациентов с инсультами, болезнью Паркинсона, рассеянным склерозом, эпилепсией, боковым амиотрофическим склерозом, последствиями токсического, травматического и инфекционного поражения центральной нервной системы. Показано, что результат лечения при инсультах зависит от сроков проведения аутотрансплантации с момента развития заболевания и от способа введения КСКМ. При болезни Паркинсона эффективность зависит от степени тяжести заболевания, кратности и способа введения клеточной суспензии; при рассеянном склерозе от степени инвалидизации по шкале EDSS. Метод является перспективным в лечении последствий токсического и инфекционного поражения нервной системы, эпилепсии. Отмечена хорошая переносимость метода, отсутствие побочных эффектов.

**Ключевые слова:** *клетки стромы костного мозга, нейробласты, инсульт, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз, последствия токсического и инфекционного поражения центральной нервной системы.*

**Введение.** В последние годы одним из перспективных направлений в лечении заболеваний нервной системы становится трансплантация стволовых клеток, источником которых могут служить фетальные ткани человека, эмбриональные стволовые клетки, полученные методом соматического клонирования, а также собственный костный мозг больного.

Эффективность трансплантации фетальных тканей человека для лечения многих заболеваний нервной системы показана как в эксперименте, так и в клинических исследованиях [7, 11, 16]. Однако недостатками метода являются иммунная несовместимость, техническая сложность выделения жизнеспособных фетальных нервных клеток, угроза заражения инфекционными заболеваниями, несмотря на тщательный бактериологический контроль, а также морально-этические проблемы.

Метод соматического клонирования не получила широкого распространения ввиду высокой стоимости, несовершенства, этических споров и запретов.

Альтернативой этим двум методам может стать применение собственного костного мозга

человека. В настоящее время доказана возможность дифференцировки КСКМ в клетки предшественники нервной ткани при культивировании в специфических кондиционных средах и при добавлении в среду некоторых индукторов [10, 20, 21]. В эксперименте показано, что трансплантированные нейральные клетки мигрируют в зону повреждения, образуют обширную сеть контактов с нейронами мозга, выделяют нейромедиаторы, синтезируют нейро- и астроцитоспецифические белки, трофические факторы, что способствует уменьшению выраженности апоптоза в поврежденном мозге и улучшению функционального состояния животных [13]. В то же время, аутотрансплантант не оказывает токсического влияния, не вызывает индукции опухолевого роста, иммунных реакций [18]. Данные о клиническом использовании этого метода трансплантации в неврологии немногочисленны [12, 17].

Острая сосудистая патология головного мозга остается одной из наиболее важных медицинских и социальных проблем [3, 4, 8]. Поэтому разработка новых методов лечения этой патологии является актуальной темой, так как

может способствовать уменьшению продолжительности нетрудоспособности и инвалидизации больных после инсульта.

В настоящее время ни один метод лечения не останавливает прогрессирующее нейродегенеративных заболеваний, в частности, болезни Паркинсона [5], бокового амиотрофического склероза (БАС), а также рассеянного склероза — демиелинизирующего заболевания, быстро приводящего к инвалидности и поражающего людей молодого трудоспособного возраста [9]. Клеточная терапия может стать перспективным методом решения этой проблемы.

**Целью** работы было изучение возможности дифференцировки КСКМ мыши и человека *in vitro* в клетки-предшественники нервной ткани; исследование эффекта трансплантации КСКМ, индуцированных в нейральные, на экспериментальной модели ишемии у мышей, оценка клинических эффектов аутотрансплантации нейроклеток, полученных из КСКМ человека, при некоторых заболеваниях нервной системы.

#### **Материалы и методы исследования.**

##### ***Получение культуры КСКМ мыши и их дифференцировка в нейробласты***

Костный мозг получали из берцовых костей лабораторных мышей путем промывания их раствором Хэнкса. Ткань ресуспендировали и дважды отмывали в этом растворе центрифугированием в течение 10 мин при скорости 1000 об./мин. Отмытые клетки ресуспендировали в культуральной среде DMEM/F12 (1/1) с 10% фетальной бычьей сыворотки и рассеивали по 5 млн. клеток на культуральный сосуд (25 см<sup>2</sup>). Клетки культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в воздухе. Через 24 ч культивирования среду с не прикрепившимися к субстрату клетками костного мозга удаляли и продолжали культивировать оставшиеся прикрепленными клетки в свежей питательной среде еще 10 сут для получения первичной культуры КСКМ (*рис.1 цветной вкладки*).

Для дифференцировки КСКМ мыши в нейробласты использовали кондиционную среду, полученную путем культивирования в течение 3 сут первичной культуры эмбриональных фибробластов мыши, выделенных по методу Фрешни [15], а также среду с 2% фетальной бычьей сыворотки и ретиноевой кислотой (10<sup>-6</sup> М) — известным нейроиндуктором, используемым для нейродифференцировки эмбриональных стволовых клеток [14].

Морфологию клеток изучали как в живой культуре, так и после фиксации метанолом и окрашивания специфическими красителями. Фиксацию и окрашивание проводили прямо в культуральном сосуде (25 см<sup>2</sup>, Nunc). Ней-

робласты окрашивали 0,03% раствором амидо черного 10Б по Альцгеймеру [6] в нашей модификации, а также 1% раствором метиленового фиолетового.

##### ***Размножение в культуре и нейроиндукция КСКМ человека***

Костный мозг выделяли из костно-губчатой ткани (1 см<sup>3</sup>) подвздошной кости пациента. Ткань ресуспендировали и трижды отмывали в этом растворе, осаждая клетки центрифугированием в течение 10 мин при скорости 1000 об./мин. Клетки рассеивали в культуральные флаконы (80 см<sup>2</sup>, Nunc) и культивировали в среде DMEM/F12 с 20% фетальной бычьей сыворотки (Sigma). Через 24 ч среду с неприкрепившимися клетками костного мозга удаляли, трижды промывали флаконы раствором Хэнкса, добавляли свежую среду и продолжали культивировать прикрепленные фибробластоподобные КСКМ человека при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в воздухе до образования первичной культуры.

Для индукции дифференцировки КСКМ в нейральные клетки использовали свежие клетки первичной культуры второго и третьего пассажей, а также деконсервированные КСКМ. В качестве индуктора дифференцировки использовали ретиноевую кислоту (10<sup>-6</sup> М) в среде с 2% сыворотки крови пациента. Морфологию дифференцирующихся клеток оценивали в живой культуре, а также после фиксации метанолом или формальдегидом с последующей окраской по Гимза, Альцгеймеру или флуоресцентными антителами.

##### ***Иммуноцитохимический метод выявления белков в клетках***

Культуры с дифференцирующимися нейральными клетками человека промывали раствором Хэнкса и фиксировали в 4% растворе параформальдегида в течение 30 мин. Зафиксированные клетки трижды промывали в растворе Хэнкса и инкубировали в 5% бычьего сывороточного альбумина (1 ч) на растворе Хэнкса, чтобы избежать неспецифического связывания антител. Для иммуноцитохимического выявления белков, специфичных для нейральных клеток, использовали мышинные антитела к нестину и кроличьи антитела к виментину (ICN Biomedical, Inc.). Препараты инкубировали с первичными антителами при 4°C в течение ночи. В качестве вторичных антител использовали поликлональные лошадиные антимышинные антитела с зеленой флуоресцентной меткой для выявления нестина и козы антикроличьи антитела с красной флуоресцентной меткой для виментина (Vector laboratories). Между инкубациями с антителами препараты тщательно

промывали в растворе Хэнкса. Наличие меченых клеток в препарате оценивали с помощью люминесцентного микроскопа.

### **Ауто трансплантация КСКМ, индуцированных в нейральные, пациентам с разными заболеваниями нервной системы**

Проведена ауто трансплантация КСКМ, индуцированных в нейральные, 53 пациентам: 3 мужчинам в возрасте 53, 48 и 49 лет и 1 женщине в возрасте 75 лет — после перенесенного ишемического мозгового инсульта, 1 женщине в возрасте 16 лет — после спинального инсульта, 7 (4 женщин и 3 мужчин в возрасте от 24 до 64 лет) — после геморрагического инсульта, 1 мужчине в возрасте 26 лет — после субарахноидального кровоизлияния, 9 (5 мужчин и 4 женщины в возрасте от 54 до 73 лет) — с болезнью Паркинсона, 18 (8 мужчин и 10 женщин в возрасте от 19 до 47 лет) — с достоверным диагнозом рассеянного склероза (критерии Mc Donald, 2001) [19], 4 — с боковым амиотрофическим склерозом, 6 — с токсической энцефалопатией, обусловленной приемом суррогатных наркотических средств, содержащих эфедрин и марганец, 1 — с болезнью Штрюмпеля, 1 — с последствием компрессионного перелома C<sub>IV</sub> позвонка, 1 — с эпилепсией, 1 — с последствием инфекционно-аллергического слипчивого арахноидита. Все пациенты подписали информированное согласие на проведение ауто трансплантации КСКМ, индуцированных в нейральные клетки.

Больным с ишемическими нарушениями мозгового кровообращения проводилось эндолюмбальное введение клеточного материала, 2 больным с геморрагическим инсультом — клеточную суспензию вводили в ложе удаленной гематомы, 5 — эндолюмбально, пациенту, перенесшему субарахноидальное кровоизлияние — субокципитально, 5 больным с болезнью Паркинсона — субокципитально, 4 — эндолюмбально. В двух случаях при болезни Паркинсона в связи с отсутствием эффекта проводились повторные ауто трансплантации через месяц, в первом случае проведено 2 введения, во втором случае — 4. При рассеянном склерозе и БАС проводили эндолюмбальное введение КСКМ, индуцированных в нейральные. Обычно для каждой клеточной трансплантации использовали  $1-1,5 \times 10^6$  нейробластов в 2-3 мл изотонического раствора натрия хлорида.

Всем больным проведено тщательное клинико-неврологическое исследование перед трансплантацией и через 2 нед после введения КСКМ, индуцированных в нейральные клетки. Пациенты с болезнью Паркинсона обследовались также через месяц после трансплантации. Для

оценки динамики неврологических нарушений при инсультах нами применялись Скандинавская шкала инсульта (1985, 2003 гг.), характеризующая выраженность неврологического дефицита, и шкала Бартеля (Mahony, Barthel, 1965), характеризующая уровень повседневной активности пациентов (табл. 1). У пациентов с болезнью Паркинсона для оценки выраженности нарушений применялась шкала Hoehn, Yahr, (1967), а для оценки динамики заболевания в процессе лечения — унифицированная рейтинговая шкала оценки болезни Паркинсона (UPDRS). Эффективность лечения больных с рассеянным склерозом оценивалась по следующим параметрам: прогрессирование инвалидизации — по шкале EDSS; количество, распространенность и активность очагов — на МРТ; оценка качества жизни и изменений психики (тесты первичного скрининга деменций — MMSE, тест 10 слов, таблица Шульце, тест Бентона). Исследование неврологического и психического статуса у больных с рассеянным склерозом проводилось в динамике через каждые 3 мес, МРТ — каждые 6 мес.

**Таблица 1. Оценка динамики неврологических нарушений с помощью Скандинавской шкалы и шкалы Бартеля (в баллах)**

Динамика	Скандинавская шкала	Шкала Бартеля
Отрицательная	- (1-60)	- (1-100)
Отсутствует	0	0
Минимальная	+ (1-6)	+ (1-10)
Умеренная	+ (7-12)	+ (11-20)
Значительная	+ (13-18)	+ (21-30)
Максимальная	+ (19-30)	+ (31-50)

### **Результаты и их обсуждение**

#### **Индукцированная нейродифференцировка КСКМ мышцы и человека в культуре**

В результате изучения интактной культуры КСКМ мышцы показано, что КСКМ имеют фибробластоподобный фенотип (см. рис.1 цветной вкладки) и образуют на дне культурального сосуда гетерогенные колонии, представленные двумя клеточными типами: крупными распластанными клетками с большим ядром и 1-2 ядрышками и мелкими веретеноподобными клетками.

После культивирования первичной культуры КСКМ мышцы в кондиционной среде, полученной на монослое первичных эмбриональных фибробластов мышцы, на 3-4-е сутки в культуре обнаружены клетки, имеющие морфологию нейробластов. На этой стадии они чаще всего имеют веретенообразную форму с одним или двумя полярными отростками, заканчиваю-

щимися филоподиями (*рис. 2а, 2б цветной вкладки*), реже встречаются мультиполярные клетки с короткими отростками на стадиях ранней дифференцировки. Отростки некоторых нейробластов имеют характерные расширения (колбы) и конусы роста в дистальной части (*рис. 2в цветной вкладки*), с помощью которых происходит их рост. Аналогичные морфологические признаки (почки и конусы роста с филоподиями), характерные для нейробластов, дифференцирующихся в нейроны, подробно описаны в работах по нейрогенезу [2].

Через 2 нед культивирования в кондиционной среде обнаружено, что часть КСКМ пролиферирует, сохраняя недифференцированное состояние. Такие клетки имеют фибробластоподобный фенотип и обнаруживаются в культуре рядом с дифференцирующимися нейробластами (*рис. 3 цветной вкладки*). Возможно, это обусловлено тем, что стволовая нейроклетка при делении дает начало нейробласту и еще одной стволовой нейроклетке. Нейробласты часто выстраиваются в цепочки, контактируя между собой растущими отростками (*рис. 3 цветной вкладки*).

Отмечается более поздняя дифференцировка пирамидных и звездчатых нейральных клеток по сравнению с веретенообразными, что соответствует данным литературы о такой последовательности этапов нейрогенеза в норме у животных [1].

Используя в качестве одного из индукторов дифференцировки нейральных клеток ретиновую кислоту, мы получили в культуре КСКМ мыши на 3-и сутки индукции 30% нейробластов, однако они не контактировали между собой, возможно, из-за низкой плотности посева клеток.

КСКМ человека отличаются от КСКМ мыши тем, что колонии клеток, которые они образуют на дне сосуда, менее гетерогенны и представлены преимущественно однообразными фибробластоподобными клетками с крупным ядром и 1–4 ядрышками (*рис. 4 цветной вкладки*).

Дифференцировка нейральных клеток из КСКМ человека начинается через 1–2 ч после добавления к ним индукционной среды. Тела клеток становятся оптически более плотными и приобретают форму веретен с активно растущими отростками. Дифференцирующиеся КСКМ человека экспрессировали гены белков ранней нейродифференцировки — нестина и виментина, обнаруженных иммуноцитохимически (*рис. 5 цветной вкладки*).

Мы полагаем, что для клеточной терапии следует использовать именно такие дифференцирующиеся клетки, а не дифференцированные нейроны, для того чтобы они могли закончить процесс дифференцировки в организме пациента и установить контакты с его собственными нервными клетками.

### ***Исследование эффектов трансплантации КСКМ, дифференцированных в нейробласты, на экспериментальной модели ишемии у мышей***

Экспериментальная модель ишемии получена на 10 лабораторных мышах путем перевязки ствола общей сонной артерии. Через 2 нед после развития моторного дефицита в виде контралатерального гемипареза 5 животным вводили КСКМ мыши, индуцированные в нейрональные. Введение суспензии нейробластов (по 50 тыс. клеток в 20–40 мкл) осуществляли через трепанационное отверстие на глубину 5 мм в зону повреждения мозга.

У 3 опытных мышей через 2 нед после трансплантации нейробластов отмечено частичное восстановление двигательной активности. Неврологический статус у мышей с ишемией, которым не проводили нейротрансплантацию, не изменился.

Морфологию тканей мозга изучали на серийных срезах, окрашенных гематоксилином-эозином, через 4 нед после трансплантации КСКМ.

В результате патоморфологического анализа срезов мозга мышей, которым проведена трансплантация КСКМ, индуцированных в нейральные, выявлены следующие особенности:

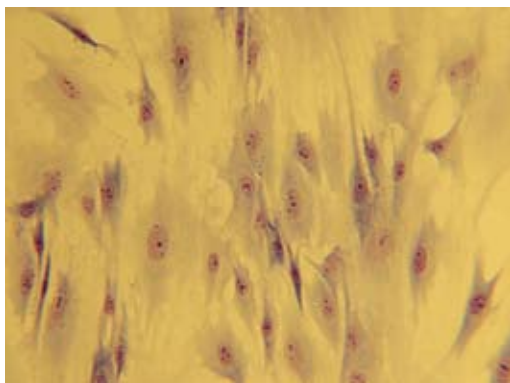
- менее выраженные, чем у животных без трансплантации, дистрофические изменения, вызванные гипоксией, в виде разрыхления глии, ее гидратации;
- более активные процессы новообразования сосудов и пролиферации клеток микроглии, которые можно рассматривать как репаративные процессы на тканевом уровне.

### ***Анализ клинической эффективности трансплантации нейроиндуцированных КСКМ человека при некоторых заболеваниях нервной системы***

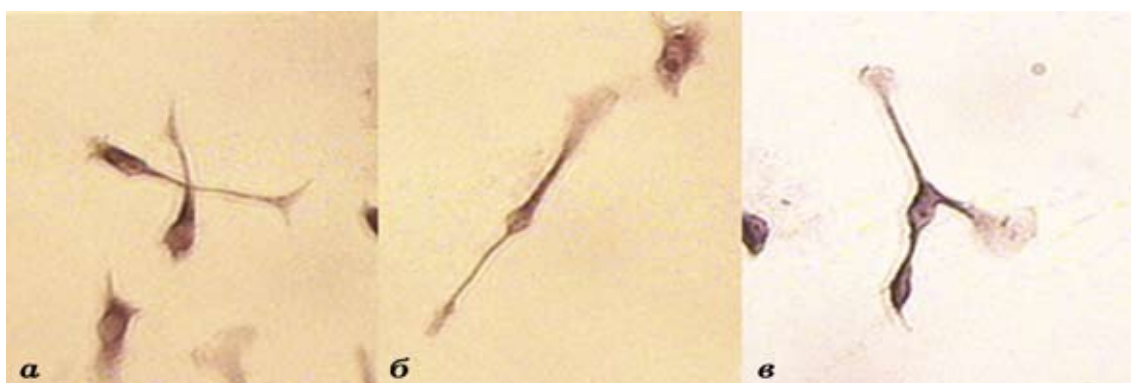
У 5 больных с ишемическими нарушениями мозгового и спинального кровообращения сроки от возникновения инсульта до введения индуцированных КСКМ составили соответственно 3 мес, 4 мес, 1 год, 1,5 года и 3 нед.

Через 2 нед после трансплантации у всех больных отмечена положительная динамика в виде уменьшения мышечного тонуса, увеличения объема движений и мышечной силы в паретичных конечностях. Кроме того, у больной со спинальным инсультом регрессировали сфинктерные нарушения в виде задержки мочи, у 2 больных с моторной афазией улучшилась речь.

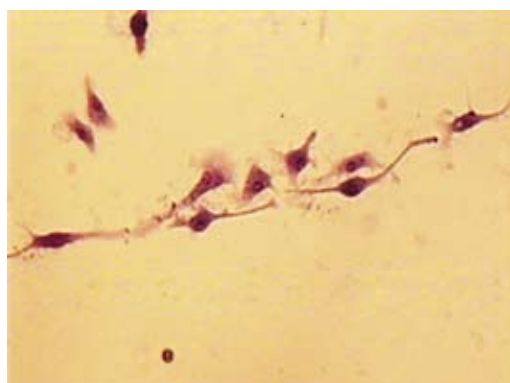
Динамику неврологических нарушений по оценочным шкалам можно охарактеризовать как значительную (Скандинавская шкала) и максимальную (шкала Бартеля) у больной, которой ауто трансплантация нейроклеток проведена



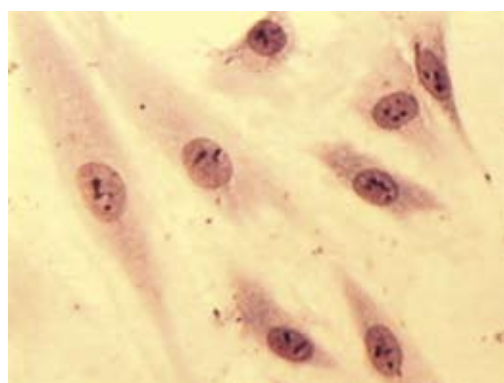
**Рис.1.** Первичная культура КСКМ мыши на 10-е сутки культивирования. Окраска по Гимза. Ув.  $\times 400$ .



**Рис.2.** Дифференцировка нейробластов в разные типы нейронов. а — два униполярных нейрона; б — биполярный нейрон; в — мультиполярный нейрон с почкой роста на одном из дендритов. Окраска по Альцгеймеру. Ув.  $\times 400$ .



**Рис.3.** Цепочка дифференцирующихся нейробластов мыши на 10-е сутки после индукции. Окраска метиленовым фиолетовым. Ув.  $\times 400$ .



**Рис.4.** Культура КСКМ человека на 10-е сутки культивирования. Окраска по Гимза. Ув.  $\times 600$ .



**Рис.5.** Экспрессия нестина (зеленые клетки) и виментина (красные клетки) в нейробластах человека, индуцированные из КСКМ в среде с ретиноевой кислотой. Иммуноцитохимия. Ув.  $\times 200$ .

в наиболее ранний срок от развития инсульта (3 нед).

4 больным с геморрагическим инсультом аутотрансплантацию нейроиндуцированных КСКМ проводили через 1 мес после развития инсульта, 2 — через 3 года. Во всех этих случаях ранее проведено оперативное лечение — удаление гематомы. Пациенту с перенесенным субарахноидальным кровоизлиянием проведено клипирование аневризмы. У всех этих больных в неврологическом статусе до нейротрансплантации отмечались грубые спастические гемипарезы до уровня плечей, у 1 — сенсомоторная афазия. Одна больная перенесла геморрагический инсульт 9 лет назад, в неврологическом статусе — акинетико-ригидный синдром.

Через 2 нед после аутонейротрансплантации наиболее выраженная положительная динамика отмечена у больных, которым КСКМ, индуцированные в нейральные, вводили в ложе удаленной гематомы через 1 мес после развития инсульта. Начиная с 5-х суток после трансплантации отмечено увеличение объема движений в паретичных конечностях, у больной с явлениями сенсомоторной афазии улучшилась речь. По оценочным шкалам динамику восстановления нарушенных функций можно охарактеризовать как умеренную.

У 2 больных с инсультом, которым трансплантация проведена эндолюмбально, также отмечена положительная динамика, но она минимальна по оценочным шкалам. У 3 больных состояние осталось без изменений.

Динамика неврологических нарушений по оценочным шкалам у больных с инсультом через 2 нед после аутотрансплантации КСКМ, индуцированных в нейральные клетки, приведена в *табл. 2, 3*.

У 6 пациентов с болезнью Паркинсона отмечена дрожательно-ригидная форма, у 2 — акинетико-ригидная, у 1 — дрожательная форма. Заболевание в стадии 3.0 (по Hoehn, Yahr, 1967) отмечено у 5 пациентов, в стадиях 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 5 — по одному наблюдению.

Наиболее выраженная положительная динамика после введения КСКМ, индуцированных в нейральные, в виде уменьшения дрожательного гиперкинеза, уменьшения скованности, увеличения повседневной активности отмечена у 3 пациентов, возраст которых не превышал 55 лет, в стадии заболевания не выше 2.0 (по Hoehn, Yahr, 1967). У одного из этих больных, которому клеточная трансплантация проведена субокципитально, отмечен полный регресс дрожательного гиперкинеза уже через 1 нед после процедуры. Динамика состояния по Унифицированной шкале для оценки тяжести болезни Паркинсона составила в среднем 25 баллов.

**Таблица 2.** Динамика неврологических нарушений у больных с инсультом через 2 нед после введения нейроиндуцированных КСКМ (по Скандинавской шкале инсульта)

Динамика	Число больных
Отрицательная	—
Отсутствует	3
Минимальная	6
Умеренная	2
Значительная	1
Максимальная	0
Всего	12

**Таблица 3.** Динамика неврологических нарушений у больных с инсультом через 2 нед после введения нейроиндуцированных КСКМ (по шкале Бартеля)

Динамика	Число больных
Отрицательная	—
Отсутствует	3
Минимальная	4
Умеренная	3
Значительная	1
Максимальная	1
Всего	12

У 6 пациентов в возрасте от 54 до 73 лет в стадии заболевания от 2.5 до 3.0 (по Hoehn, Yahr, 1967) не отмечено положительной динамики через 2 нед после эндолюмбального введения КСКМ. Двое из этих больных более 5 лет принимали левадопосодержащие препараты, у одного отмечены выраженные моторные и вегетативные флуктуации. Однако через 1 мес эти пациенты отмечали стабилизацию состояния и отсутствие прогрессирования заболевания, уменьшение выраженности моторных флуктуаций. Одной пациентке 54 лет в стадии заболевания 3.0 в последующем проведено еще 3 клеточных трансплантации, но субокципитально. Только после второго введения она отметила уменьшение скованности, снижение тонуса, что позволило ей уменьшить дозу противопаркинсонических препаратов. Еще одной больной 64 лет с выраженной дрожательной формой заболевания через 1 мес повторно введены нейральные клетки субокципитально, после чего отмечался положительный эффект в виде уменьшения выраженности тремора, что улучшило ее самообслуживание.

При рассеянном склерозе длительность заболевания составила у 5 пациентов — 5 лет, у 1 — 10 лет, у 5 — 7 лет, у 1 — 3 года, у 1 — 12 лет, у 1 — 18 лет, у 1 — 6 лет. По шкале

EDSS состояние оценено от 4 до 8 баллов. У всех диагностирован вторично-прогрессирующий тип течения заболевания.

При проведении психологических исследований этих больных получены данные, различные по структуре и степени выраженности когнитивных расстройств. Ведущими в структуре когнитивного дефицита явились нарушения мышления, памяти и внимания.

На МР томограммах супра- и субтенториально (перивентрикулярно, в области мозолистого тела и ствольных отделов мозга, мозжечка), в веществе спинного мозга (преимущественно шейных и верхне-грудных отделов) диагностированы очаги демиелинизации. Обследование проведено в режиме T1 и T2, что позволяло оценить характер морфологических изменений (зоны демиелинизации, глиоз, наличие “черных дыр”). Как правило, наличие “черных дыр” коррелировало с клиническими проявлениями заболевания. При первичном обследовании у больных выявлено от 8 до 12 очагов на T2 изображениях, на T1 без контрастного усиления количества очагов пониженного МР-сигнала (“черных дыр”) колебалось от 4 до 18.

Фактор стабилизации во всех исследованиях, касающихся вторично-прогрессирующих типов течения рассеянного склероза, использовали как основной фактор оценки, так как у этой категории больных стабилизация состояния считается высокодостоверным показателем эффективности лечения. У всех пациентов на протяжении времени наблюдения отмечалась стойкая стабилизация процесса, в 15 случаях (83%) с регрессом клинической симптоматики. В среднем отмечалось улучшение по шкале EDSS на 1,6 балла через 6 мес наблюдения. Более выраженное уменьшение показателей по шкале EDSS (от 2 до 3,5 балла) отмечено у больных с легкой и средней степенью инвалидизации (не более 6 баллов). У обследованных пациентов в ходе лечения происходила позитивная трансформация паттерна показателей, отражающих их актуальное психическое состояние, общую когнитивную продуктивность и качество жизни в целом.

При проведении МРТ исследования после нейротрансплантации в динамике в 7-ми случаях отмечена стабилизация МРТ показателей в виде отсутствия появления новых очагов, уменьшения в размерах старых. В 8-ми случаях количество и размеры очагов уменьшились. У пациентов с боковым амиотрофическим склерозом и болезнью Штрюмпеля не отмечено ни стабилизации процесса, ни положительной динамики.

У больного с последствиями спинальной травмы в виде грубого спастического тетрапареза также не отмечено положительной

динамики, что, возможно, связано с длительно существующим (в течение 3 лет) тяжелым неврологическим дефицитом.

У пациентов с токсической энцефалопатией, вызванной приемом суррогатных наркотиков, содержащих эфедрин и марганец, после аутонейротрансплантации отмечена положительная динамика в виде уменьшения выраженности акинетических расстройств и особенно улучшения походки. Один пациент стал передвигаться без помощи костылей.

У пациента с эпилепсией до лечения отмечали частые (2–3 раза в день) генерализованные и малые эпилептические приступы. После аутотрансплантации КСКМ, индуцированных в нейральные, через 1 мес генерализованные приступы прекратились, сохранились редкие приступы по типу *pti mal*.

Больная с последствиями инфекционно-аллергического адгезивного арахноидита с грубым нижним спастическим парапарезом через 1 мес после трансплантации КСКМ отметила снижение мышечного тонуса в нижних конечностях и стала передвигаться в пределах квартиры без помощи костылей.

Ухудшения состояния не отмечено ни в одном из случаев.

#### **Выводы.**

1. КСКМ мышцы дифференцируются в клетки-предшественники нервных клеток (нейробласты) при культивировании в кондиционной среде, полученной на культуре первичных эмбриональных фибробластов мышцы.

2. Под действием ретиноевой кислоты 30% КСКМ мышцы и человека дифференцируются в нейробласты.

3. Введение КСКМ, индуцированных в нейральные, при экспериментальных моделях ишемии на мышцах способствует уменьшению неврологического дефицита и активирует регенеративные процессы на тканевом уровне.

4. На основании анализа предварительных результатов клинических исследований можно сделать выводы о более оптимальных сроках и методах введения нейроиндуцированных КСКМ пациента при инсульте и болезни Паркинсона, рассеянном склерозе, а также безопасности данного метода лечения.

5. Для достижения лучшего положительного эффекта аутотрансплантацию КСКМ, индуцированных в нейральные целесообразно проводить в более ранние сроки от начала инсульта. При геморрагическом инсульте лучшие результаты дает введение нейроиндуцированных КСКМ в ложе удаленной гематомы.

6. При болезни Паркинсона целесообразно проведение данного метода лечения на более ранних стадиях заболевания, а для достижения положительного эффекта в тяжелых стадиях

необходимы повторные трансплантации, по возможности, субокипитально.

7. Аутооттрансплантация нейроиндуцированных КСКМ может являться терапией выбора у больных рассеянным склерозом. Лучший прогноз отмечен у пациентов с легкой и средней степенью инвалидизации.

8. При токсической энцефалопатии, вызванной применением суррогатных наркотических средств, содержащих эфедрин и марганец, аутооттрансплантация нейроиндуцированных КСКМ способствует стабилизации патологического процесса и улучшению неврологического статуса больных.

Данный метод является также перспективным при лечении последствий нейроинфекций.

9. При боковом амиотрофическом склерозе и болезни Штрюмпеля у пациентов на поздних стадиях заболевания не получено убедительных данных об эффективности аутооттрансплантации нейроиндуцированных КСКМ.

#### Список литературы

- Богословская Л. С., Поляков Г.И. Пути морфологического прогресса нервных центров у высших позвоночных. — М.: Изд-во "Наука". — 1981.- 160с.
- Будко К.П., Гладкович Н.Г., Максимова Е.В. и др. Нейроонтогенез. М.: Наука, 1985. — 270с.
- Віничук С.М. Судинні захворювання головного мозку. — Київ: "Наукова думка", 1999. — 213 с.
- Волошин П.В., Тайцлин В.И. Лечение сосудистых заболеваний головного и спинного мозга. — М.: Знание-М, 1999. — 555 с.
- Голубев В.Л., Левин Я.И., Вейн А.М. Болезнь Паркинсона и синдром паркинсонизма. — Москва: МЕДпресс, 2000. — 416 с.
- Микроскопическая техника: Руководство / Под ред. Д.С. Саркисова и Ю.Л. Перова. — М.: Медицина, 1996. — 544с.
- Миронов Н.В., Шмырев В.И., Бугаев В.С., Аникин А.Ю. Применение нейротрансплантации фетальных клеток головного мозга человека в лечении некоторых неврологических заболеваний // Трансплантация фетальных тканей человека. — Москва, 1996. — С.50-52.
- Москаленко В.Ф., Волошин П.В., Петрашенко П.Р. Стратегія боротьби з судинними захворюваннями головного мозку // Український вісник психоневрології. — 2001. — Т. 9, вип. 1(26). — С. 5-8.
- Рассеянный склероз. Избранные вопросы теории и практики. Под редакцией Завалишина И.А., Головкина В.И. — М.: "Детская книга" Роскомпечати, при участии ООО "Эльф ИПР", 2000.- 639с.
- Щегельская Е.А., Микулинский Ю.Е., Корочкин Л.И., Ревещин Е.А., Омельченко Е.А., Кульшин В.Е., Грищенко В.И. Индуцированная дифференцировка клеток стромы костного мозга мыши в нервные клетки // Цитология. — 2002. — Т.44., № 7.— С.637- 641.
- Яворская В.А., Гребенюк Г.В., Фломин Ю.В. Лечение цереброваскулярных и нейродегенеративных заболеваний с применением тканевой и клеточной трансплантации // Проблемы криобиологии. — 2001. — №3. — С.37-38.
- Barker R.A., Jain M., Armstrong R.J.E., Caldwell M.A. Stem cells and neurological disease // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. — 2003. — V.74, n 5. — P.553-557.
- Chop M, Hofstetter C.P, Schwarz E.J, Hess D, Widenfalk J, Manira A.El., Prokop D.J, Olson L. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery.// PNAS. — 2002. — V. 99, n 4. — P.2199-2204.
- Fraichard A., Chassande O., Bilbaut G. et al. In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. // J. Cell Sci. — 1995. — V.108, n.10. — P.3181-3188.
- Freshny R.I. Culture of animal cells. A manual of basic technique. Alan R Liss, Inc., New York. — 1987. — 397p.
- Kelly S., Bliss T.M., Shah A.K., Sun G.H. et al. Transplantation human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex // PNAS. — 2004. — V. 101, n 32. — P.11839-11844.
- Lawrence R., Wechsler, MD; Douglas Kondziolka, MD. Cell Therapy: Replacement // Stroke. — 2003. — V.34.- P.2081.
- Lu D., Wang L., Chen J., Machmood A., Chop M. Intraarterial administration of marrow stromal cells in a rat model of traumatic brain injury // Neurotrauma. — 2001 — V.18, n 8. — P.813-819.
- McDonald W., Compston A., Edan G., et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis; Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis // Ann. Neurol. — 2001. — Vol. 50. — P. 121-127.
- Prockop D.J., Azizi S.A., Phinney D.G., Kopen G.C., Schwarz E.J. Potential use of marrow stromal cells as therapeutic vectors for diseases of the central nervous system. // Prog. Brain Research. — 2000. — V. 128. — P.293-297.
- Sanchez-Ramos J., Song S., Cardozo-Pelaez F., Hazzi C., Stedeford T., Willing A., Freeman T.B., Saporta S., Janssen W., Patel N., Cooper D.R. Sanberg P.R. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. //Experimental Neurology. — 2000. — V.164. — N 2. — P.247-256.



**Отримання нейробластів із клітин стромы кісткового мозку та їх клінічне застосування при деяких захворюваннях нервової системи**

*Яворська В.О., Волошина Н.П., Хвусюк В.В., Гребенюк Г.В., Гаврюшин О.Ю., Грецький К.В., Пелехова О.Л., Микулинський Ю.Ю., Василовський В.В., Шестопалова Л.Ф., Щегельська О.А.*

Показано можливість диференціації *in vitro* клітин стромы кісткового мозку миші в клітини-попередники нервової тканини в умовах культивування у специфічних кондиційних середовищах та при додаванні в середовище деяких індукторів.

При експериментальних моделях ішемії на мишах показано, що перебіг репаративних процесів на тканинному рівні відбувається більш активно у лабораторних тварин, яким вводились клітини стромы кісткового мозку, що індуквані в нейральні.

Проведено аналіз клінічної ефективності аутотрансплантації клітин стромы кісткового мозку, які індуквані в нейральні клітини у хворих на інсульт, хворобу Паркінсона, розсіяний склероз, епілепсію, боковий аміотрофічний склероз, при наслідках токсичного, травматичного та інфекційного ураження центральної нервової системи. Показано, що результат лікування при інсультах залежить від строків проведення аутотрансплантації від моменту захворювання та від методики введення клітинного препарату. При хворобі Паркінсона ефективність залежить від ступеня важкості захворювання, кратності та методики введення клітинної суспензії, при розсіяному склерозі від ступеня інвалідації за шкалою EDSS. Цей метод є перспективним у лікуванні наслідків токсичного, інфекційного ураження нервової системи, епілепсії. Відмічено добре перенесення методу лікування та відсутність побічних ефектів.

**Receiving of neuroblasts from bone marrow stromal cells and its clinical application in patients with some diseases of nervous system**

*Yavorskaya V.A., Voloshina N.P., Khvysyuk V.V., Grebenyuk A.V., Gavryushin A.Yu., Gretskeych K.V., Pelekhova O.L., Mikulinsky Yu.E., Vasilovskiy V.V., Shestopalova L.F., Shchegelskaya E.A.*

The possibility of differentiation *in vitro* of mouse bone marrow stromal cells into progenitor of neuronal cells has been shown with condition of specific medias and some inductors using for cultivation.

Reparation on tissue level was more active in mice with experimental ischemia of brain after transformed into neural cells bone marrow stromal cells transplantation.

The analysis of clinical efficiency of transformed into neural cells autologous bone marrow stromal cells transplantation has been carried out in patients with stroke, Parkinson's disease, multiple sclerosis, epilepsy, amyotrophic lateral sclerosis, after-effects of a toxic, traumatic, infective impairment of a nervous system. The results of patients with stroke treatment depended on the disease duration and method of grafting. The efficiency of transformed into neuronal cells autologous bone marrow stromal cells transplantation in patients with Parkinson's disease depended on the severity degree of the disease, in patients with multiple sclerosis — from degree of disability (scale EDSS). This method is perspective in treatment of after-effects of a toxic, infective impairment of a nervous system, epilepsy. No implant-related adverse events have occurred.

**Комментарии**

*к статье Яворской В.А., Володиной Н.П., Хвусюк В.В. и др. "Получение нейробластов из клеток стромы костного мозга и их клиническое применение при некоторых заболеваниях нервной системы"*

Работа посвящена разработке крайне важной проблемы в области заместительной клеточной терапии — получению популяции нейробластов с помощью нейроиндукции клеток стромы костного мозга (КСКМ) и оценке клинической эффективности их аутотрансплантиации больным. Достоинством работы является достаточной большой экспериментальный и клинический материал, обобщающий результаты лечения 53 больных с различной неврологической и нейрохирургической патологией, которым трансплантировалась суспензия нейроклеток, содержащих нейробласты. Результаты представленного комплексного исследования, выполненного большим коллективом авторов, обеспечивают серьезный прорыв на пути к практическому внедрению аутотрансплантиации нейробластов, полученных в результате трансдифференцировки КСКМ как метода, альтернативного традиционному лечению ряда заболеваний ЦНС, в том числе малокурабельных.

Во вступлении статьи приводится краткое обоснование преимущества данного метода клеточной терапии. Клиническим исследованиям эффективности применения нейроаутотрансплантиации больным неврологического и нейрохирургического профиля предшествовали 3 серии экспериментов. Первая серия опытов проведена с целью методической отработки получения популяции нейроклеток путем индукции КСКМ мышей при культивировании на монослое первичных эмбриональных фибробластов в кондиционной питательной среде и в среде, содержащей ретиноевую кислоту, которая является общепризнанным индуктором нейрогенной дифференцировки.

Во второй серии опытов на мышах оценен лечебный эффект аутотрансплантиации таких нейроклеток при моделированной ишемии с развитием неврологической симптоматики в виде моторного дефицита. В третьей серии экспериментов с помощью аналогичных методических подходов, отработанных в первой серии опытов, получены нейроклетки с содержанием 30% нейробластов из КСКМ человека в условиях культивирования и таким образом обеспечена возможность использовать такой клеточный материал для нейроаутотрансплантиации у пациентов с различными заболеваниями ЦНС.

Представленные в работе экспериментально-морфологические данные показали развитие дифференцировки в культурах КСКМ мыши и человека в виде нейробластоподобных клеток уни- и биполярной формы с наличием полярных отростков, снабженных филоподиями. Наряду с этим в таких культурах авторы наблюдали проявления индукции фенотипически более дифференцированных мультиполярных форм нейроцитов с образованием дендритов, которые выявляют уже на 3–4-е сутки, а также через 2 нед культивирования. Такие проявления ранней и поздней нейродифференцировки КСКМ получены при их культивировании в кондиционной среде, а также при инкубации с ретиноевой кислотой. Нейрогенный цитогенез этих клеток подтвержден иммуногистохимическим выявлением в них нестина и виментина — специфических маркеров стволовых пролиферирующих и прогениторных нейроцитов, 30% из которых на 3-и сутки культивирования приобретали фенотип нейробластов. По нашему мнению, нуждается в коррекции трактовка образования из делящихся КСКМ стволовых и коммитированных клеток, т.е. клеток-предшественников, (а не нейробластов!), способных вступить на путь специализированной дифференцировки.

Представление результатов культивирования КСКМ человека с последующей индукцией нейродифференцировки (3-я серия экспериментов) нуждается в некоторых уточнениях условий эксперимента, например, в отношении сроков добавления в питательную среду ретиноевой кислоты, а также наличия (или отсутствия) каких-либо особенностей в фенотипических проявлениях нейродифференцировки в культурах первичных, пассированных (2-й, 3-й пассаж) и деконсервированных КСКМ. Сопоставительный анализ таких наблюдений в этих вариантах опытов имеет важное практическое значение для последующего выбора оптимальных условий обеспечения нейрогенной дифференцировки КСКМ в культурах, что должно быть отражено в выводах работы. Если в каждой из этих групп получены однотипные данные или каких-либо различий выявить не удалось, то и это является важным практическим выводом для последующей работы.

Представляет также теоретический и практический интерес обсуждение возможных причин временных различий проявления индуцированной нейродифференцировки в культурах КСКМ мышей (на 3–6-е сутки) и человека (уже через 1–2 ч) после добавления ретиноевой кислоты.

Положительный результат внутримозговой нейротрансплантации с частичным клиническим эффектом получен у мышей с моделированной ишемией. В этой группе у 3 из 5 животных через 2 нед после введения в зону ишемии мозга суспензии нейроцитов наблюдалось клиническое улучшение по сравнению с контрольными животными. По нашему мнению, при морфологической характеристике ткани мозга опытных мышей после аутооттрансплантации нейроцитов существенно важно было бы оценить распространенность ишемического очага и выраженности патологических клеточно-тканевых реакций со стороны нейронов и клеток глии как в очаге моделированной ишемии, так и в перифокальной зоне мозга опытных животных по сравнению с аналогичными данными у животных группы сравнения (условный контроль). Правомерно предположить, что диагностированный положительный санирующий эффект внутримозговой нейроаутооттрансплантации при ишемии мозга мышей мог бы быть наиболее убедительно подтвержден фотодукоментированным сопоставлением особенностей микроскопической картины мозга в опытах после клеточной терапии и у мышей, не получавших такое лечение.

В клиническом фрагменте работы представлен ряд весьма наглядных и убедительных наблюдений, демонстрирующих отчетливое улучшение клинического состояния и качества жизни большинства больных с различной неврологической патологией после проведения аутооттрансплантации нейроцитов. Важно отметить, что констатация динамики клинических показателей состояния леченых больных оценена с помощью объективных общепринятых международных стандартных критериев. Вместе с тем, по нашему мнению, в материалах этого раздела работы содержится весьма значимый резерв и большой потенциал для дальнейшего более многостороннего анализа полученных результатов, что могло бы стать предметом специального рассмотрения.

Например, привлечение группы сравнения больных с подбором соответствующих контингентов с аналогичной (той или иной) неврологической патологией, лечившихся традиционно, т.е. не получавших сеансов клеточной терапии, и затем проведение сопоставительного клинического анализа эффективности лечения больных в обеих группах могло бы способствовать максимальной объективизации положительного лечебного воздействия аутооттрансплантации нейроцитов на клиническое течение заболеваний ЦНС. Особую актуальность представляет такой анализ, в частности, при рассмотрении эффективности нейротрансплантации у больных в случаях тяжелых малокурабельных заболеваний ЦНС, как например, рассеянный склероз.

С нашей точки зрения, является также уместной и целесообразной трактовка возможных механизмов наблюдаемой положительной динамики лечения больных в каждой из анализируемых групп после проведения клеточной терапии с анализом соответствующей литературы, если таковая имеется.

Таким образом, в представленной работе являются несомненными и заслуживают одобрительной оценки актуальность разрабатываемой проблемы, конкретная постановка исследовательских задач, применение адекватных современных методических подходов к их решению, новизна и оригинальность в постановке экспериментов, а также практическая и теоретическая значимость полученных положительных клинических результатов применения нейроаутооттрансплантации у больных с разнообразной патологией нервной системы.

Приведенные рекомендации не снижают ценность статьи, отражают личные впечатления рецензента и ориентируют авторов на дальнейшее углубление разрабатываемой проблемы.

*В.М. Семенова, доктор мед. наук  
зав. лабораторией культивирования тканей  
Института нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова АМН Украины*