

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

УДК 602.9:[616.832–004.2:615.37

ЗАФРАНСКАЯ
Марина Михайловна

**МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ:
ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА
И ОБОСНОВАНИЕ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ КЛЕТОЧНОЙ
ИММУНОТЕРАПИИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Минск 2016

Научная работа выполнена в государственном учреждении образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Научный консультант: Демидчик Юрий Евгеньевич, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси, заведующий кафедрой онкологии государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Официальные оппоненты: Доценко Марина Леонидовна, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры инфекционных болезней учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Лихачев Сергей Алексеевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий неврологическим отделом государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии»

Генералов Игорь Иванович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической микробиологии учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Оппонирующая организация: учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»

Защита состоится 9 ноября 2016 года в 12.00 часов на заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.04 при учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет» по адресу: 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83, телефон 8 (017) 272-55-98, e-mail: uchsovet@bsmu.by.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Автореферат разослан «___» октября 2016 г.

Ученый секретарь совета Д 03.18.04
по защите диссертаций,
кандидат медицинских наук, доцент



А. М. Дронина

ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) – хроническое мультифакториальное прогрессирующее демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы (ЦНС) с выраженными воспалительным, миелин- и аксон-дегенеративным компонентами и вовлечением клеток иммунной системы в развитие патологического процесса [Е. И. Гусев и др., 2004; D. Hafler, 2005; T. Holmoy, 2007; M. Sospedra, R. Martin 2009; R. Hohlfeld et al., 2016]. РС является одной из наиболее социально и экономически значимых проблем современной неврологии, развивается преимущественно у молодых лиц в возрасте от 18 до 50 лет и при отсутствии адекватного лечения приводит к значимым нарушениям неврологических функций и ранней инвалидизации. Распространенность заболевания в различных регионах Республики Беларусь составляет 30–45 случаев на 100 000 населения [В. Я. Латышева и др., 2004; Г. К. Недзьведь, 2005; Т. М. Шамова и др., 2006; С. А. Лихачев и др., 2012; А. Ю. Куликов, Р. И. Ягудина, 2015].

Используемые при данной патологии кортикостероиды, иммуносупрессанты и методы эфферентной терапии не дают продолжительного, устойчивого эффекта, а существующие направления селективной антиген-специфической иммунотерапии, основанные на применении модифицированных пептидных лигандов, моноклональных антител, ДНК- и Т-клеточной вакцинации, не всегда являются эффективными [R. Hohlfeld et al., 2004; P. L. Jager et al., 2007; M. K. Racke et al., 2011; D. Karussis, 2012; O. Fernandez et al., 2013; T. Ruck et al., 2015; B. O. Khatri, 2016; S. K. Lundy et al., 2016]. Отсутствие оптимальных протоколов лечения РС, направленных на селективное подавление аутореактивных клонов Т-лимфоцитов и восстановление поврежденных участков ЦНС, объясняет все возрастающий интерес исследователей к использованию мезенхимальных стволовых клеток [A. Uccelli et al., 2006, 2011; P. J. Darlington et al., 2011].

Мезенхимальные стволовые/стромальные клетки (МСК) представляют собой гетерогенную популяцию постнатальных клеток-предшественников стромального происхождения, могут быть выделены из различных тканей организма и, наряду с регенеративным потенциалом, обладают выраженными как *in vitro*, так и *in vivo* иммуномодулирующими свойствами [M. F. Pittenger et al., 1999; A. Nasef et al., 2008; A. Tyndall, A. Uccelli, 2009]. Несмотря на клиническое использование МСК в неврологии, механизмы терапевтического эффекта клеточной терапии неясны вследствие неполного понимания биологии МСК, взаимодействия с локальным микроокружением и алгоритма использования клеточных культур [D. Karussis et al., 2008; A. Uccelli et al., 2013]. Проблемы применения МСК в терапии РС связаны с нерешенными вопросами использования аутологических или аллогенных культур, дозы клеточного трансплантата, способа введения и продолжительности эффекта. Не определена взаимосвязь между

выявляемыми эффектами МСК *in vitro* и *in vivo*, что объясняется отсутствием универсального общепринятого *in vitro* метода определения потенциального терапевтического эффекта МСК [N. Singer, A. Caplan, 2011]. Кроме того, при исследовании *in vivo* иммунный статус определяется множеством эндогенных и экзогенных факторов, что затрудняет оценку функционального состояния отдельных пулов аутореактивных клеток при РС.

Важным этапом патогенетической терапии является разработка критериев, позволяющих оценить иммуномодулирующее действие вводимых клеточных культур на иммунный ответ реципиента. В настоящее время описаны гуморальные и лиганд-рецепторные взаимодействия, опосредующие супрессорный/регуляторный эффект МСК [A. Nasef et al., 2008; R. E. Newman et al., 2009]. В то же время изменения функциональной активности лимфоцитов после клеточной терапии оцениваются по узкому спектру параметров с преимущественным анализом экспрессии активационных маркеров на Т-лимфоцитах и дендритных клетках в ранние сроки посттрансплантационного периода [D. Karussis et al., 2010; P. Connick et al., 2012]. В связи с этим для оценки регуляторного эффекта МСК *in vivo* на течение аутоиммунного процесса при РС необходимо создание адекватной *in vitro* модели МСК-индуцированной иммуносупрессии с обоснованием иммунологических критериев оценки эффекта клеточной терапии. Предварительная *in vitro* оценка иммуносупрессивного потенциала МСК у пациентов с РС представляет исключительный интерес с точки зрения персонализации терапевтического протокола и подготовки состоятельного клеточного трансплантата, что позволит уменьшить число рецидивов заболевания и, в свою очередь, будет иметь экономическую и социальную значимость.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами), темами

Тема диссертационной работы соответствует положениям п.п. 4.2, 4.4 и 4.7 перечня приоритетных направлений фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2006–2010 годы (постановление Совета Министров Республики Беларусь от 17 мая 2005 г. № 512), положениям п.п. 3.2, 4.1, 4.2 и 4.4 перечня приоритетных направлений научных исследований Республики Беларусь на 2011–2015 годы (постановление Совета Министров Республики Беларусь от 19.04.2010 г. № 585) и положениям п.п. 4 Указа Президента Республики Беларусь от 22 апреля 2015 г. № 166 «О приоритетных направлениях научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2016–2020 годы».

Диссертационное исследование выполнено в рамках НИР: «Изучить возможности направленной дифференцировки стволовых клеток человека

в клетки разных типов тканей при культивировании *in vitro*» ГКПНИ «Современные технологии в медицине» (№ госрегистрации 20066804 от 20.12.2006 г., 2006–2010 гг.); «Получить *in vitro* мезенхимальные стволовые клетки и изучить влияние клеточных культур на антиген-специфические и антиген-неспецифические реакции Т-лимфоцитов при аутоиммунных процессах демиелинизирующих заболеваний центральной нервной системы» ГКПНИ «Современные технологии в медицине» (№ госрегистрации 20081618 от 23.07.2008 г., 2008–2010 гг.); «На основе иммунорегуляторных свойств мезенхимальных стволовых клеток разработать метод патогенетического лечения больных рассеянным склерозом с применением аутологичной трансплантации клеточных культур» подпрограмма «Трансплантология и регенеративная медицина» ГНТП «Новые технологии диагностики и лечения» (№ госрегистрации 20112544 от 12.08.2011 г., 2011–2013 гг.); «Разработать и внедрить технологию терапии пациентов с рассеянным склерозом на основании мониторинга иммуномодулирующего эффекта аутологичных мезенхимальных стволовых клеток в отдаленный посттрансплантационный период» подпрограммы «Трансплантология и регенеративная медицина» ГНТП «Новые технологии диагностики и лечения» (№ госрегистрации 200150751 от 03.06.2015 г., 2015–2016 гг.).

Цель исследования: обоснование иммунопатогенетического действия и клинического внедрения клеточной терапии аутологичными мезенхимальными стволовыми клетками при рассеянном склерозе.

Задачи исследования:

1. Разработать методологию оценки иммуносупрессивного действия МСК на модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита у крыс.
2. Определить критерии иммуносупрессивного действия МСК костного мозга пациентов с РС на неспецифическую и антиген-специфическую пролиферацию Т-клеток и их субпопуляций *in vitro*.
3. Исследовать роль внутриклеточного и внеклеточного синтеза ИФН- γ , ИЛ-4, ИЛ-10, ФНО- α и TGF- β Т-лимфоцитами пациентов с РС в иммуномодулирующем действии МСК *in vitro* и *in vivo*.
4. Оценить роль простагландина E₂ и индолеамин-2,3-диоксигеназы в механизмах, опосредующих иммуносупрессивную активность МСК костного мозга пациентов с РС.
5. Разработать метод предварительной *in vitro* оценки иммуносупрессивного влияния МСК на антиген-неспецифическую и миелин-индуцированную пролиферацию Т-клеток памяти у пациентов с РС для обоснования терапевтического использования аутологичных МСК и прогнозирования клинической эффективности клеточной иммунотерапии РС.

6. Оценить отдаленный иммуномодулирующий эффект клеточной терапии у пациентов с РС через 9–12 месяцев после введения аутологичных МСК.

7. Определить биомаркеры, характеризующие нейропротекторный эффект клеточной терапии.

8. Определить диагностическую ценность иммунологических показателей в прогнозе клинической эффективности лечения РС с использованием клеточной терапии аутологичными МСК.

Объект исследования: пациенты с РС, лабораторные крысы линии Wistar с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом (ЭАЭ), культуры МСК костного мозга (КМ) человека и животных, мононуклеары периферической крови (МПК) человека, спленоциты крыс, кондиционированные среды (супернатанты) клеточных культур и кокультур.

Предмет исследования: фенотипическая, иммуносупрессивная и иммунорегуляторная характеристики аутологичных и аллогенных культур МСК КМ и МПК пациентов с различными формами течения РС; антиген-неспецифический и миелин-специфический пролиферативный ответ Т-клеток памяти; механизмы иммуносупрессивного действия культур МСК с участием простагландина E₂ (ПГЕ₂) и IDO (индолеамин-2,3-диоксигеназа) – ИФН- γ -зависимого путей; фенотипическая характеристика, цитокиновый профиль Т-клеточных субпопуляций пациентов с РС после клеточной терапии; нейропротекторный эффект аутологичных МСК пациентов с РС; прогностическая ценность иммунологических критериев в оценке терапевтической эффективности клеточной терапии РС аутологичными МСК.

Научная новизна. Впервые обосновано применение новой методологии лечения РС с использованием аутологичных МСК с учетом предварительной оценки терапевтической эффективности клеточной терапии. Изучены иммунорегуляторные свойства МСК на антиген-специфические и антиген-неспецифические реакции Т-лимфоцитов и их субпопуляций у пациентов с РС. Показана способность МСК КМ пациентов с РС регулировать пролиферацию лимфоцитов и продукцию про- и противовоспалительных цитокинов, и идентифицированы ПГЕ₂ и индолеамин-2,3-диоксигеназные механизмы, характеризующие супрессивную активность МСК. Впервые показано, что аутологичные МСК КМ пациентов с РС и аллогенные МСК от здоровых лиц в равной степени ингибируют *in vitro* митоген- и миелин-стимулированную пролиферацию патогенетически значимых Т-клеток памяти, что обосновывает применение МСК для клеточной иммунотерапии РС.

Впервые предложена *in vitro* модель совместного культивирования лимфоцитов и МСК и коэффициент МСК-индуцируемой супрессии миелин-стимулированной пролиферации Т-лимфоцитов для прогнозирования эффективности клеточной терапии пациентов с РС с использованием МСК.

Впервые проведена оценка иммуномодулирующего эффекта клеточной терапии у пациентов с РС в отдаленный период после введения МСК. Показано, что тромбоцитарный фактор роста и иммуноглобулин класса М сыворотки крови можно использовать в качестве биологических маркеров, характеризующих нейпротекторные процессы после введения МСК. Впервые показано, что клеточная терапия пациентов с РС с применением аутологичных МСК не приводит к выраженному подавлению функционального состояния Т-лимфоцитов в отношении поликлональной стимуляции, что характеризует функциональную состоятельность клеток иммунной системы в реализации иммунного ответа. Впервые обоснован подход к оценке терапевтического эффекта клеточной иммунотерапии РС, основанный на определении миелин-стимулированной пролиферации Т-лимфоцитов и изменении поверхностного фенотипа клеток.

Положения, выносимые на защиту

1. Аутологичные и аллогенные мезенхимальные стволовые клетки в равной степени ингибируют *in vitro* митоген- и миелин-стимулированную пролиферацию эффекторных Т-клеток памяти пациентов с рассеянным склерозом, что обосновывает применение аутологичных культур для клеточной терапии заболевания. Уровень выраженности иммуносупрессивного действия мезенхимальных стволовых клеток на миелин-индуцированную пролиферацию Т-лимфоцитов находится в обратной зависимости от степени выраженности неврологического дефицита пациентов и является дополнительным критерием отбора для клеточной иммунотерапии.

2. Уровень экспрессии CD45RO и CD119 на активированных Т-лимфоцитах при совместном культивировании с мезенхимальными стволовыми клетками характеризует функциональное состояние клетки, отражает иммуносупрессивный потенциал клеточных культур и может применяться для индивидуальной оценки иммуномодулирующих свойств мезенхимальных стволовых клеток пациентов с рассеянным склерозом. Использование модели *in vitro* совместного культивирования митоген-/миелин-стимулированных лимфоцитов с мезенхимальными стволовыми клетками позволяет прогнозировать вероятность терапевтической эффективности клеточной терапии у пациентов с рассеянным склерозом на основании расчетов коэффициентов МСК-индуцируемой супрессии (k) митоген-/миелин-стимулированной пролиферации Т-клеток памяти.

3. Простагландин E₂ и индолеамин-2,3-диоксигеназа являются одними из факторов МСК-опосредуемой иммуносупрессии у пациентов с рассеянным склерозом, что характеризует состоятельность клеточных культур в реализации иммуномодулирующих свойств. Мезенхимальные стволовые клетки пациентов с рассеянным склерозом проявляют иммуномодулирующие эффекты как

в результате межклеточного контакта с клетками иммунной системы, так и посредством гуморальных факторов, продуцируемыми активированными Т-лимфоцитами.

4. Фенотипические изменения лимфоцитов периферической крови и динамика миелин-/митоген-стимулированной продукции цитокинов мононуклеарами периферической крови через 3–6 месяцев после клеточной терапии могут быть связаны с усилением регуляторного потенциала клеток иммунной системы пациентов с рассеянным склерозом. Тромбоцитарный фактор роста и иммуноглобулин класса М сыворотки крови выступают в качестве биологических маркеров, характеризующих нейропротекторные процессы после клеточной терапии.

5. Внутривенное введение аутологичных мезенхимальных стволовых клеток пациентам с рассеянным склерозом приводит к снижению количества циркулирующих Т-клеток памяти и подавлению *in vitro* миелин-стимулированной пролиферации Т-лимфоцитов к 9–12 месяцам периода наблюдения. У пациентов с рассеянным склерозом после клеточной терапии в течение 1 года не происходит выраженного ингибирования неспецифической защиты, что проявляется в низких коэффициентах супрессии митоген-индуцированной пролиферации Т-лимфоцитов и отсутствии ингибирующего влияния клеточных культур на продукцию провоспалительных цитокинов в условиях неспецифической стимуляции *in vitro*.

Коэффициент МСК-индуцируемой супрессии миелин-стимулированной пролиферации Т-лимфоцитов имеет высокую диагностическую ценность для прогнозирования клинической эффективности лечения рассеянного склероза с использованием аутологичной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток и отражает взаимосвязь между определяемыми эффектами мезенхимальных стволовых клеток *in vitro* и *in vivo*.

Личный вклад соискателя ученой степени. Соискателем самостоятельно проведены патентно-информационный поиск по теме диссертационного исследования, анализ отечественной и зарубежной литературы и оценка актуальности выбранной темы, проблемных вопросов и путей их решения. Цель и задачи исследования сформулированы совместно с научным консультантом. Соискателем самостоятельно разработан и сформулирован дизайн и методология исследования, проведен сбор первичных материалов, сформированы базы данных и проведена систематизация и статистическая обработка результатов. Планирование и постановка экспериментов, интерпретация результатов проточной цитометрии выполнены соискателем лично (вклад соискателя – 100%) на базе научно-исследовательской лаборатории ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования» (БелМАПО). Культуральные и экспериментальные исследования на лабораторных

животных, выделение и мониторинг культур МСК, иммуноцитохимическое, молекулярно-генетическое исследование, иммуноферментный анализ проведены совместно с сотрудниками иммунологической группы: канд. биол. наук Нижегородовой Д. Б., канд. биол. наук Юркевич М. Ю., Кулинич С. С., Иванчик Г. И. Личный вклад соискателя – 65%.

Отбор и клинико-иммунологическое мониторинг пациентов проводился совместно с сотрудниками кафедры нервных и нейрохирургических болезней УО «Белорусский государственный медицинский университет» (БГМУ) (канд. мед. наук, доцент Борисов А. В., канд. мед. наук Мотузова Я. М.) под руководством заведующего кафедрой доктора медицинских наук профессора Федулова А. С. Костный мозг включенных в исследование пациентов получен на базе отделения трансплантации костного мозга УЗ «9-я ГКБ» г. Минска (заведующий отделением канд. мед. наук Миланович Н. Ф.). Подготовка клеточного трансплантата осуществлялась на базе лаборатории клеточных биотехнологий УЗ «9-я ГКБ» г. Минска (заведующий лабораторией канд. биол. наук Дедюля Н. И.). Клеточная терапия аутологичными МСК пациентам с РС выполнена на базе УЗ «9-я ГКБ» г. Минска (заместитель главного врача по науке канд. мед. наук Кривенко С. И.) в условиях Республиканского центра гематологии и пересадки костного мозга.

Основные научные результаты, изложенные в диссертации, получены автором лично, обсуждены с научным консультантом и представлены в монографии [1], вклад – 85%; статьях в рецензируемых научных журналах, соответствующих пункту 18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь [2–22], вклад – 90% и сборниках материалов конференций [23–37], тезисах докладов [38–53], вклад – 95%. Соискателем самостоятельно сформулированы положения, выносимые на защиту, выводы, научная новизна и практическая значимость исследования. В соавторстве получено 4 патента [54–57], подана заявка на изобретение [58], подготовлены и утверждены 2 инструкции по применению [59, 60].

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов.

Основные результаты и положения диссертационной работы представлены и обсуждены на Ежегодной объединенной конференции Немецкого и Скандинавского иммунологических сообществ (Киль, Германия, 2005); VI Международной школе по проточной цитометрии «Antigen Specific Flow-Cytometry» (Берлин, Германия, 2005), Международной научно-практической конференции «Состояние и перспективы трансплантологии» (Минск, 2008), 2-м Симпозиуме Европейской Федерации Иммунологических Сообществ (Белград, Сербия, 2008), 8-й Международной научной конференции «Сахаровские чтения 2008 года: экологические проблемы XXI века» (Минск, 2008), XVII Всероссийском форуме «Нейроиммунология» и научно-

практической конференции неврологов (Санкт-Петербург, Россия, 2009), 10-й Международной научной конференции «Сахаровские чтения 2010 года: экологические проблемы XXI века» (Минск, 2010), 39-й конференции Скандинавского общества иммунологов, объединенной с Балтийским иммунологическим сообществом (Таллинн, Эстония, 2010), 14-м Конгрессе Европейской Федерации Неврологических Сообществ (Женева, Швейцария, 2010), 10-м Международном конгрессе по нейроиммунологии (Ситжес, Барселона, Испания, 2010), Молодежном инновационном форуме и выставке научных достижений молодых ученых высших учебных заведений Министерства образования Республики Беларусь (Минск, 2010), XIV Всероссийском научном форуме с международным участием «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, Россия, 2011), Международном симпозиуме IMPULSE 2011 (Вишеград, Венгрия, 2011), VII съезде гематологов и трансфузиологов Республики Беларусь «Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии» (Минск, 2012), 3-м Европейском конгрессе по иммунологии (Глазго, Великобритания, 2012), Объединенном иммунологическом форуме (Нижний Новгород, Россия, 2013), 15-м Международном конгрессе по иммунологии (Милан, Италия, 2013), I Евразийском конгрессе «Трансплантация стволовых клеток» (Минск, 2013), Международной конференции по регенеративной медицине (Лейпциг, Германия, 2013), XII Международном конгрессе по нейроиммунологии (Майнц, Германия, 2014), 14-й Международной научно-практической конференции «Сахаровские чтения 2014 года: экологические проблемы XXI века» (Минск, 2014), Международной конференции «Cell Technologies at the Edge» (Санкт-Петербург, Россия, 2016).

Результаты исследований внедрены в практическую деятельность неврологических отделений № 2 и № 4 УЗ «9-я ГКБ» г. Минска, лаборатории клеточных биотехнологий и отделения трансплантации костного мозга Республиканского центра гематологии и пересадки костного мозга УЗ «9-я ГКБ» г. Минска, лаборатории иммунологических исследований ГУ «РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии», в учебный процесс кафедры клинической лабораторной диагностики БелМАПО, кафедры иммунологии УО «Международный государственный экологический университет им. А. Д. Сахарова», кафедры нервных и нейрохирургических болезней БГМУ (12 актов внедрения).

Опубликование результатов диссертации. По материалам диссертации опубликовано: 1 монография (12,44 авторских листов); 21 статья в рецензируемых научных журналах, соответствующих пункту 18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь (12,25 авторских листов), из них в зарубежных научных изданиях – 8 (3 статьи в странах дальнего зарубежья, 5 статей в странах ближнего зарубежья)

(4,85 авторских листа); 15 статей в рецензируемых сборниках научных трудов и материалах конференций (1,75 авторских листа); 16 тезисов докладов. Общий объем опубликованных материалов составил 30,94 авторских листов.

Структура и объем диссертации. Диссертация написана в традиционном стиле, изложена на 236 страницах, включая 27 таблиц и 53 рисунка, состоит из введения, общей характеристики работы, аналитического обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 5 глав собственных исследований, заключения, библиографического списка, включающего 415 использованных источников (25 русскоязычных, 390 иностранных) и 61 публикацию соискателя (40 русскоязычных и 21 иностранных). Приложения представлены на 27 страницах.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Материал и методы исследования. Исследуемую группу составили 37 пациентов с диагнозом «рассеянный склероз», находившихся на лечении в неврологических отделениях УЗ «9-я ГКБ» г. Минска в период с октября 2007 по май 2014 года. Экспериментальные исследования проводились на лабораторных крысах линии Wistar.

Материал исследования: культуры МСК КМ 37 пациентов с РС и 8 здоровых доноров группы сравнения (n=118); МПК пациентов с РС и 23 здоровых лиц группы сравнения (n=144); культуры МСК жировой ткани (ЖТ) и КМ 11 лабораторных крыс линии Wistar с выраженными клиническими признаками ЭАЭ, и 11 здоровых крыс (группа сравнения); спленоциты здоровых (группа сравнения, n=12) и с клинически развившимся ЭАЭ крыс линии Wistar (экспериментальная группа, n=26); кондиционированные среды (супернатанты) клеточных культур и кокультур.

Характеристика пациентов с РС, не прошедших клеточную терапию аутологичными МСК, и здоровых доноров группы сравнения (исследования in vitro). Основную группу составили 25 пациентов с диагнозом «рассеянный склероз», находившихся на лечении в неврологических отделениях УЗ «9-я ГКБ» г. Минска в период с октября 2007 по май 2010 года. Средний возраст пациентов (13 мужчин и 12 женщин) составил 31,9 лет (от 20 до 52 лет). Средняя продолжительность заболевания – 60,6 месяцев (от 2 до 180 месяцев). У 13 пациентов (52%) отмечалось рецидивно-ремиттирующее течение РС, у 7 (28%) – прогрессивно-ремиттирующее течение РС и у 5 (20%) пациентов – вторично-прогрессирующее течение заболевания. Медиана уровня выраженности неврологического дефицита ($Me(25\div 75)$) по EDSS составила 3,5(1,5÷6,5) баллов.

Группу сравнения составили 23 здоровых добровольца, сопоставимых по возрасту и полу. Костный мозг 8 человек из группы сравнения получен на базе отделения трансплантации костного мозга УЗ «9-я ГКБ» г. Минска от

родственных доноров пациентов с онкогематологическими заболеваниями, которым была показана аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. Средний возраст доноров составил 36,12 (от 16 до 55) лет.

Характеристика пациентов с РС, прошедших клеточную терапию аутологичными МСК (исследования in vivo). В исследуемую группу включено 12 пациентов с рецидивно-ремиттирующей клинической формой РС, которым проведена клеточная терапия – аутологичная трансплантация МСК (АТМСК) в количестве 1,55(0,92÷2,35) млн клеток/кг массы тела (*Me* (25÷75)) на базе УЗ «9-я ГКБ» г. Минска в условиях Республиканского центра гематологии и пересадки костного мозга в период с августа 2011 по май 2014 года. Возраст пациентов (м:ж – 6:6) составил 33,0(25,5÷35,5) года, длительность заболевания – 30,0(9,5÷84,0) месяцев, выраженность неврологического дефицита по *EDSS* – 2,75(2,00÷3,25) балла. Пациенты с РС, включенные в исследование, не получали препаратов, модифицирующих клиническое течение заболевания, до проведения клеточной терапии и в посттрансплантационном периоде.

Критерии включения: 1) рецидивно-ремиттирующий тип течения РС при количестве баллов по шкале *EDSS* от 1 до 4,5, верифицированный на основании критериев McDonald с соавт. (2010г.) [J. F. Kurtzke, 1983; С. Н. Polman et al., 2011]; 2) прогрессирование заболевания (ухудшение неврологического статуса за последний год > 1 балла по шкале *EDSS* (если исходный уровень *EDSS* составлял < 5,0 баллов) либо на 0,5 балла (если исходный уровень *EDSS* составлял > 5,5 баллов)); 3) отсутствие эффекта от терапии, модифицирующей клиническое течение заболевания, и отсутствие эффекта/ухудшение патоморфологических показателей по данным нейровизуализации в течение 6 месяцев до забора биологического материала.

Критерии исключения: 1) беременность, лактация; 2) тяжелые сопутствующие заболевания (застойная сердечная недостаточность, инфаркт миокарда, пневмония, сепсис, кровотечения, декомпенсированный сахарный диабет, кахексия); 3) выраженные отклонения от нормальных возрастно-половых показателей; 4) психические нарушения; онкологические заболевания.

Нейрометаболическая терапия проводилась 1–2 курсами в течение года после АТМСК. Период наблюдения пациентов составил 12 месяцев. Алгоритм оценки иммуномодулирующих свойств МСК пациентов с РС и клинко-иммунологические параметры для мониторинга пациентов с РС до и после проведения клеточной терапии представлены в таблице 1.

Моделирование ЭАЭ. Для индукции ЭАЭ у лабораторных крыс линии Wistar массой 150–180 г использовался метод активной подкожной иммунизации гомогенатом спинного мозга (рационализаторское предложение № 69 от 11.02.2009 г.; выдано ГУО «БелМАПО») в соотношении 1:1 в модифицированном полном адьюванте Фрейнда (Sigma, Германия) с содержанием *M. tuberculosis* 5 мг/мл [M. Mannie, 2009].

Таблица 1. – Оцениваемые клинические и лабораторные параметры у пациентов с РС до и после проведения клеточной терапии аутологичными МСК

<i>Алгоритм исследования</i>
1. Параметры предтрансплантационной подготовки МСК КМ
Морфологический анализ МСК, динамика роста культур, полипотентность
Фенотипирование МСК (CD90, CD105, CD13, CD44, CD73, CD29, CD34, CD45)
Количество жизнеспособных клеток в трансплантате, %
Бактериологический посев для контроля стерильности трансплантата
2. Иммунологические параметры до и после проведения клеточной терапии
Фенотипирование МПК (CD3 ⁺ , CD3 ⁺ CD4 ⁺ , CD3 ⁺ CD8 ⁺ , CD25 ⁺ , CD19 ⁺ , CD3 ⁺ 56 ⁺ , CD56 ⁺ , γδТ-лимфоциты, CD45RO ⁺ клетки памяти, CD119 ⁺)
Пролиферативный ответ МПК на поликлональный митоген ФГА и специфический Аг рМОГ с расчетом коэффициентов супрессии клеточной пролиферации
Сывороточная концентрация, а также митоген-/миелин-индуцированная продукция цитокинов в клеточных супернатантах (ИФН-γ, ИЛ-4, ФНО-α, ИЛ-10 и TGF-β)
Концентрация в сыворотке тромбоцитарного ростового фактора (PDGF), основных классов иммуноглобулинов (IgG, IgM, IgA) и циркулирующих иммунных комплексов
3. Неврологические параметры до и после проведения клеточной терапии
Мониторинг неврологического статуса по данным EDSS
Анализ динамики обострений (методы клиничко-диагностических исследований)
Анализ нейровизуализационных параметров (данные МРТ), анализ данных ОКТ
Нейрофизиологическое исследование

Выделение и культивирование МСК КМ человека. Выделенные из пунктата КМ мононуклеары в концентрации $0,6 \times 10^6 - 0,8 \times 10^6$ на 1 см^2 культурального пластика (Sarstedt, США) культивировали в среде DMEM (Lonza, Бельгия) с добавлением 10% ЭТС (HyClone, Великобритания), 2 mM глутамина (Sigma, Германия) и 1% комбинированного антибиотика (Gibco, США) при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% содержанием CO_2 (CO_2 -инкубатор, Revco Elite II, США) [S. Kern, 2006].

Для подготовки клеток к инфузии реципиенту МСК КМ трипсинизировали по стандартной методике в день трансплантации, отмывали и ресуспендировали в физиологическом растворе [P. Connick et al., 2011].

Выделение МСК КМ крыс. КМ получали промыванием бедренных костей крыс ФСБ (Gibco, США), наслаивали на градиент плотности Histopaque ($\rho=1,083 \text{ г/см}^3$) (Sigma, США) и центрифугировали 30 мин при 1500 об/мин. Полученное кольцо мононуклеаров засеивали в культуральные чашки в концентрации $10^5 - 10^6$ клеток на 1 см^2 поверхности (Sarstedt, США) [E. Gerdoni, 2007].

Адипогенная и остеогенная дифференцировки МСК осуществлялись в соответствии с протоколами [W. S. Shim et al., 2004; Y. Zhang et al., 2012].

Культивирование спленоцитов крыс. Спленоциты крыс культивировали в концентрации 2×10^5 клеток/лунку в RPMI-1640 с добавлением 10% инактивированной ЭТС в увлажненной атмосфере с 5% CO_2 при 37°C .

В качестве митогенов и специфических Аг использовали: конканавалин А (КонА, Sigma, Германия), 1 мкг/мл; миелин-олигодендроцитарный гликопротеин крысы (МОГ₃₅₋₅₅, Sigma, № M4939, Германия); миелин-олигодендроцитарный гликопротеин человека (МОГ₃₅₋₅₅, Sigma, № 13958-4, Германия); основной белок миелина человека (ОБМ₈₃₋₉₉, Sigma, № 13958-2, Германия) и протеолипидный гликопротеин человека (ПЛП₁₈₃₋₂₀₉, Sigma, № 13958-3, Германия) в концентрации 10 мкг/мл каждого пептида, соответственно.

Совместное культивирование спленоцитов осуществлялось в течение 4 и 6 суток с культурами МСК 1–4 пассажей (в соотношениях 100:1 и 10:1) или супернатантов (100 мкл/лунку), отобранных с конфлюэнтных культур МСК и кокультур МСК + спленоциты, нестимулированные и стимулированные КонА (1,0 мкг/мл) или миелиновыми пептидами.

Культивирование МПК человека. МПК культивировали в концентрации 2×10^5 клеток/лунку в среде RPMI-1640 с 25 мМ HEPES, 2 мМ L-глутамина, 1% комбинированного антибиотика (Sigma, Германия), 10% инактивированной ЭТС (Lonza, Бельгия) в течение 6 дней в присутствии фитогемагглютинаина (ФГА, Sigma, Германия) в концентрации 2,5 мкг/мл и 10 дней в присутствии рекомбинантного МОГ (pМОГ₁₋₁₂₅, ГУ РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Республика Беларусь) в концентрации 10 мкг/мл в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ при 37°C. На шестой день культивирования осуществлялась замена половины культуральной среды с добавлением ИЛ-2 (R&D Systems, США) в конечной концентрации 10 МЕ/мл [B. Bielekova et al., 2004; N. A. Danke et al., 2004].

Совместное культивирование МПК и МСК человека. МПК культивировали в концентрации 2×10^5 клеток/лунку в среде RPMI-1640 с добавлением 2,5 мкг/мл ФГА или 10 мкг/мл миелиновых Аг в присутствии МСК 1-го – 3-го пассажей, а также супернатантов различных клеточных культур или в их отсутствии при 5% CO₂, 37°C. При постановке совместного культивирования использовалось соотношение клеточных культур МПК к МСК 10:1. В качестве миелиновых Аг использовали: цельный белок ОБМ человека (Myelin basic protein antigen from human brain, Sigma, № M0689, Германия); синтетический ОБМ₆₈₋₈₂ морской свинки (Myelin basic protein fragment (68–82) guinea pig, Sigma, № M5167, Германия); синтетический МОГ₃₅₋₅₅ человека (Sigma, № 13958-4, Германия); рекомбинантный МОГ с аминокислотной последовательностью 1-125 (pМОГ₁₋₁₂₅).

Для оценки морфологии клеток и мониторинга роста клеточных культур использовали инвертированный микроскоп Axiovert 200 и камеру AxioCamMRm с выдержкой 100 мс (Carl Zeiss, Германия). Микроскопию проводили в технике проходящего света, косоого освещения и Varel-контраста. Для оценки жизнеспособности клеток применяли акридиновый оранжевый или Хекст-33342 и йодистый пропидий (Sigma, Германия) в рабочей концентрации 10^{-5} М.

Пролиферативная активность спленоцитов и кокультур крыс определялась по включению $1\mu\text{Ci}$ на лунку метил- ^3H -тимидина (Amersham, Великобритания). Уровень β -излучения измеряли на жидкостном стинцилляционном счетчике (Wallac, Финляндия).

Метод проточной цитофлуориметрии. Фенотипирование МСК осуществляли методом проточной цитометрии с использованием 5-канального проточного цитофлуориметра FC500 с программным обеспечением CXP 2.0 (Beckman Coulter, США) и 6-канального проточного цитофлуориметра FACSCanto (Becton Dickinson, США), применяя панель моноклональных антител (МАТ): CD90-FITC, CD44-FITC, CD105-PE, CD31-FITC, CD34-APC, CD45-PE-Cy7, CD13-PE, CD29-APC, CD54-APC, CD73-PE (Beckman Coulter, США, R&D, Канада).

Поверхностный фенотип МПК человека определялся с использованием моноклональных антител CD3-PC7/ECD, CD4-PC5, CD8-FITC/PC5, CCR7-PE, CD25-PE, CD45RO-ECD, CD119-PE, V δ 9-FITC/PC5 и CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 или CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 (Beckman Coulter, США, R&D, Канада). Для внутриклеточного определения ИФН- γ , ИЛ-4 и нестина в Т-лимфоцитах использовались МАТ к ИФН- γ или ИЛ-4 (Beckman Coulter, США) и первичные антитела к нестину (R&D, Канада).

Для оценки пролиферативного ответа МПК в концентрации 1×10^7 клеток/мл предварительно окрашивали карбоксифлуоресцеином (CFSE) (Sigma, Германия) в концентрации $7\mu\text{M}$. Окрашенные CFSE клетки культивировали в концентрации 2×10^5 клеток/лунку в течение 6 или 10 дней в присутствии $2,5\text{ мкг/мл}$ ФГА и миелиновых Аг (10 мкг/мл) в увлажненной атмосфере с 5% CO_2 при 37°C . Для анализа клеточного деления были установлены границы популяции $\text{CD}3^+\text{T}$ -клеток среди живых лимфоцитов, в пределах которой выделяли субпопуляции $\text{CD}3^+\text{CD}4^+$, $\text{CD}3^+\text{CD}8^+$, $\text{CD}3^+\text{CD}45\text{RO}^+$, $\text{CD}4^+\text{CD}45\text{RO}^+$, $\text{CD}8^+\text{CD}45\text{RO}^+$, $\text{CD}3^+\text{CD}119^+$, $\text{CD}4^+\text{CD}119^+$, $\text{CD}8^+\text{CD}119^+$ Т-лимфоцитов. Пролиферация оценивалась как процент непролиферирующих (CFSE^{hi}) и пролиферирующих (CFSE^{lo}) Т-клеток. Результаты регистрировались на 50 000 событий в случае [D. A. Fulcher, 1999].

Иммуноцитохимический метод определение нестина в МСК проводили с использованием первичных моноклональных мышинных Ат к нестину (R&D, Канада); антител к иммуноглобулинам мыши, конъюгированные с пероксидазой (Sigma, Германия); антител к иммуноглобулинам мыши, меченые флуоресцеин-изотиоцианатом (Sigma, Германия).

Иммунофлуоресцентный метод. МСК ($1\times 10^4/\text{мл}$) кокультивировали в лунках 24-луночного планшета с нестимулированными и митоген-активированными МПК, концентрация которых составляла $1\times 10^5/\text{мл}$ с использованием полупроницаемой мембраны с диаметром пор 5 мкм

(Nunc, Германия). Определение IDO-позитивных МСК проводили иммунофлуоресцентным методом с использованием анти-IDO-антител (Abcam, Англия) и вторичных антител, меченых NL557 (R&D Systems, Канада), в концентрациях 10 и 5 мкг/мл, соответственно.

Иммуноферментный анализ. Концентрации простагландина E2 (Parameter™ R&D Systems, США), тромбоцитарного ростового фактора PDGF-ββ (Quantikine Human PDGF-BB R&D systems, США), иммуноглобулинов отдельных классов (IgG, IgM и IgA, ЗАО «Вектор-Бест», РФ), цитокинов ИФН-γ, ФНО-α, ИЛ-10 («Вектор-Бест», РФ) и ТРФ-β (KAC1688, Invitrogen, Канада) определяли в супернатантах митоген-/миелин стимулированных культур МПК в присутствии или отсутствии МСК и в сыворотке крови с использованием коммерческих тест-систем. Оптическую плотность исследуемых образцов измеряли на спектрофотометре BRIO-SIRIO (SEAC, Италия).

Статистическая обработка данных проводилась с применением пакетов прикладных программ *Statistica 6.0* (версия 6-Index, StatSoft Inc., США, лицензионный номер AXXR012E829129FA, серийный номер NXM12EU007224005571601) и Microsoft Excel 2010 (версия 14.0.6129.5000, серийный номер 02278-001-0000106-38272) для Windows XP и *MedCalc 12.5.0.0* (MedCalcSoftware, Бельгия), адаптированных для медико-биологических исследований [О. Ю. Реброва, 2002]. Определение референтных значений коэффициента МСК-индуцированной супрессии k митоген/миелин-стимулированной пролиферации МПК проведено путем вычисления 95% доверительного интервала. Для сравнения групп использовались непараметрические методы: Манна–Уитни U тест (Mann–Whitney *U-test*), критерий Вилкоксона (Wilcoxon, *W-test*), метод Фридмана (Friedman ANOVA, *F-test*). Для анализа взаимосвязи признаков применялся метод ранговой корреляции Спирмена (R_s). Интерпретация полученных результатов осуществлялась путем определения их статистической значимости ($p < 0,05$) и оценки клинической достоверности (ROC-анализ с вычислением площади под кривой (AUROC), 95% доверительным интервалом, чувствительностью (%) и специфичностью (%)).

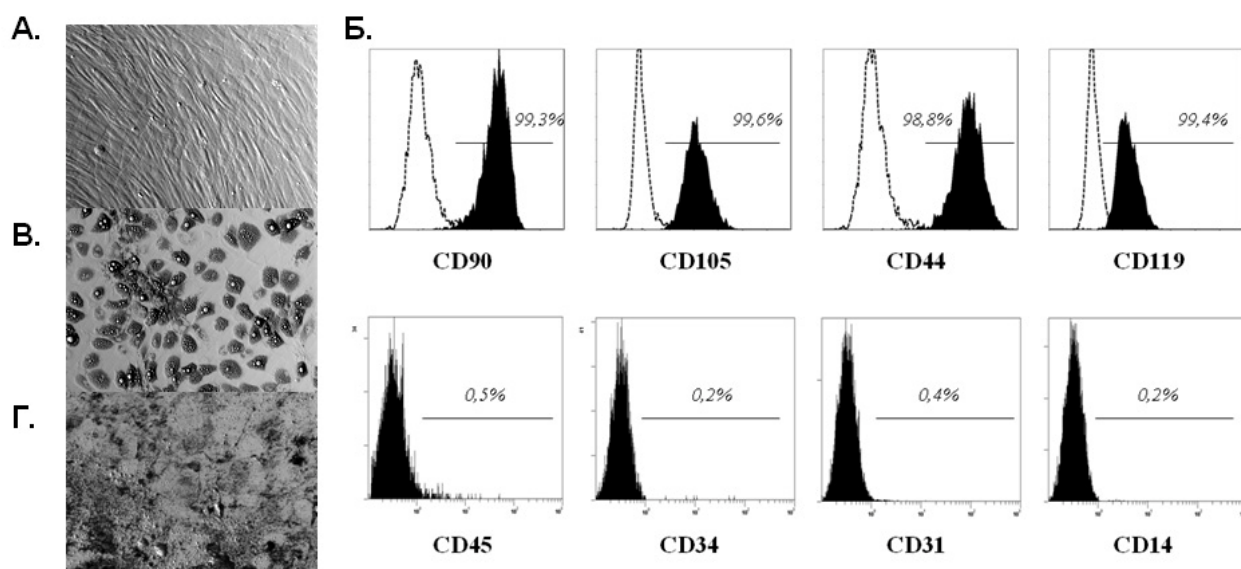
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

In vitro оценка иммуномодулирующих свойств МСК пациентов с РС

Методологический подход к культуральным исследованиям отработан на ЭАЭ. Оценка миелин-специфического пролиферативного ответа спленоцитов проведена у 6 здоровых крыс в присутствии МСК первого пассажа здоровых крыс и животных с выраженной клинической картиной ЭАЭ в соотношениях МСК:спленоциты – 1:10 и 1:100. Добавление МСК как крыс с ЭАЭ, так и группы сравнения к спленоцитам в соотношении 1:10 в равной степени

статистически значимо ингибировало антиген-специфическую пролиферацию спленоцитов (процент ингибирования составил, в среднем, $56,0 \pm 8,2\%$), в то время как добавление МСК к спленоцитам в соотношении 1:100 аналогичного эффекта не вызывало. На основании полученных результатов в дальнейших исследованиях по изучению влияния культур МСК на реакции Т-лимфоцитов *in vitro* использовано соотношение 1:10.

МСК КМ пациентов с РС имели характерный фенотип (экспрессия CD90, CD105, CD44 и CD119, при отсутствии CD34, CD31, CD45, CD14), сохраняли полипотентность на протяжении 4 изученных пассажей и не отличались от клеточных культур, полученных от здоровых лиц, по своим морфологическим, фенотипическим и функциональным особенностям (рисунок 1).



Примечание – А – конфлюэнтная культура МСК 1-го пассажа пациента с РС (ув.100×); Б – фенотипическая характеристика МСК 1-го пассажа пациента с РС; В – направленная адипогенная дифференцировка МСК КМ пациента с РС (ув. 100×); Г – направленная остеогенная дифференцировка МСК КМ пациента с РС (ув. 100×).

Рисунок 1. – Морфо-фенотипическая характеристика МСК КМ пациентов с РС

Фенотипическая характеристика мононуклеаров периферической крови пациентов с рассеянным склерозом. У пациентов с РС по сравнению с контрольной группой не выявлено статистически значимых различий как в относительном, так и в абсолютном количестве основных популяций лимфоцитов периферической крови. При этом установлено повышение абсолютного количества «двойных негативных» Т-лимфоцитов с фенотипом $CD3^+4^-8^-$ ($99,2 (67,5 \div 150,7) \times 10^6/\text{л}$ и $77,6 (62,7 \div 105,3) \times 10^6/\text{л}$ соответственно, $p=0,026$, *U-test*), НКТ-клеток с фенотипом $CD3^+56^+$ ($11,0 (3,36 \div 30,8) \times 10^6/\text{л}$ и $6,0 (2,14 \div 10,4) \times 10^6/\text{л}$ соответственно, $p=0,015$, *U-test*) и относительного количества CD25-позитивных Т-лимфоцитов ($2,8 (2,1 \div 4,2)\%$ и $1,8 (1,2 \div 2,9)\%$ соответственно, $p=0,001$, *U-test*) наряду со снижением относительного

(2,38 (1,20÷3,90)% и 3,22 (1,95÷6,90)% соответственно, $p=0,025$, *U-test*) и тенденцией к снижению абсолютного количества Т-лимфоцитов с $\gamma\delta$ Т-клеточным рецептором ($\gamma\delta$ Т-лимфоциты) (25,2 (10,6÷46,6)) $\times 10^6$ /л и 42,6 (19,6÷78,1)) $\times 10^6$ /л, $p=0,077$, *U-test*).

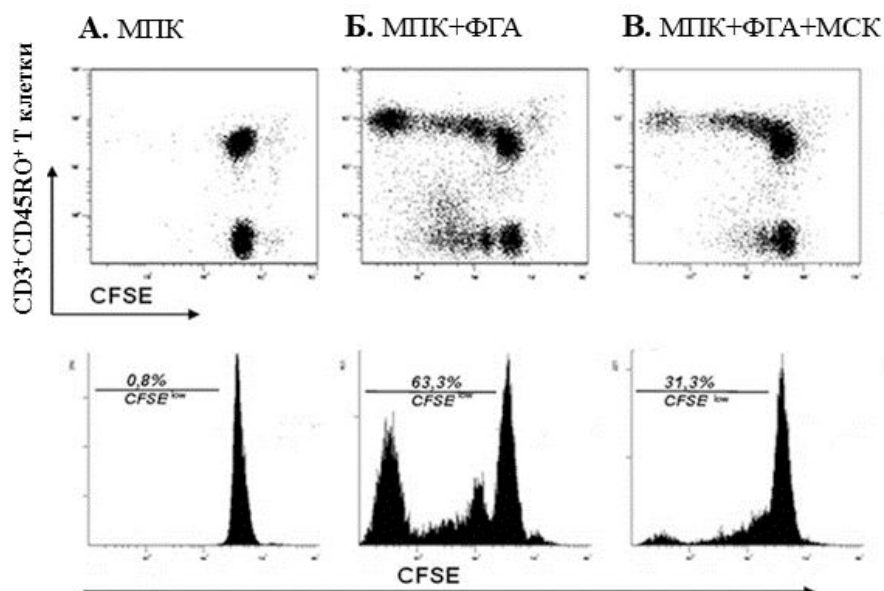
Установлено увеличение количества эффекторных Т-клеток памяти с фенотипом $CD3^+45RO^+CCR7^-$ в периферической крови пациентов с РС по сравнению с группой сравнения (17,0 (14,5÷20,5)% и 13,7 (8,9÷15,4)% соответственно, $p<0,05$, *U-test*). Количество эффекторных Т-клеток памяти коррелировало с общим процентом Т-клеток памяти в периферической крови как в группе сравнения ($R_s = 0,64$, $p<0,02$), так и у пациентов с РС ($R_s = 0,76$, $p<0,01$). Полученные данные позволили в дальнейшем использовать фенотип $CD45RO^+$ Т-лимфоцитов для характеристики функциональных свойств эффекторных $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток памяти как *in vitro*, так и *in vivo*.

In vitro оценка влияния МСК на пролиферацию Т-лимфоцитов пациентов с РС. Оценка иммуносупрессивного влияния МСК пациентов с РС на пролиферацию $CD3^+45RO^+$ Т-лимфоцитов и субпопуляций проводилась путем постановки совместного культивирования МСК ранних (1–2) пассажей с митоген- и миелин-стимулированными МПК в соотношении МСК:МПК – 1:10 с дальнейшим подсчетом коэффициентов супрессии клеточной пролиферации.

Анализ выраженности ингибиторного влияния МСК проводился с учетом: а) типа клеточной культуры МСК (аутологичная (n=13) / аллогенная (n=12)); б) типа стимулятора пролиферации лимфоцитов (ФГА и рМОГ₁₋₁₂₅); в) уровня выраженности неврологического дефицита пациентов (*EDSS*).

На рисунке 2 представлены оригинальные точечные диаграммы и их проекции в виде гистограмм результатов проточной цитофлуориметрии, отражающие изменение пролиферации $CD3^+CD45RO^+$ Т-клеток памяти в ответ на поликлональный митоген ФГА в присутствии и отсутствии аутологичных МСК 2 пассажа у пациента с РС. Спонтанная пролиферация $CD3^+CD45RO^+$ Т-лимфоцитов составила 0,8%. Добавление ФГА (рисунок 2, Б) значительно стимулировало пролиферацию Т-клеток памяти, и процент CFSE¹⁰ клеток составил 63,3%, в то время как в присутствии аутологичных МСК (рисунок 2, В) количество пролиферирующих митоген-стимулированных $CD3^+CD45RO^+$ Т-лимфоцитов снижалось до 31,3%.

Т-клетки памяти как пациентов с РС, так и здоровых доноров реагировали одинаковым количеством пролиферирующих клеток. Добавление МСК в культуру ФГА-стимулированных МПК как пациентов с РС, так и в группе сравнения приводило к статистически значимому снижению пролиферации $CD3^+CD45RO^+$ Т-лимфоцитов и $CD4^+CD45RO^+$ и $CD8^+45RO^+$ клеток.



Примечание – А – МПК – спонтанная пролиферация CD3⁺CD45RO⁺ Т-клеток памяти; Б – МПК+ФГА – ФГА-индуцированная пролиферация CD3⁺CD45RO⁺ Т-клеток памяти; В – МПК+ФГА+МСК – ФГА-индуцированная пролиферация CD3⁺CD45RO⁺ Т-клеток памяти в присутствии аутологических МСК 2 пассажа.

Рисунок 2. – Количество пролиферирующих CFSE^{lo} CD3⁺CD45RO⁺ Т-клеток памяти при митоген-индуцированной пролиферации в присутствии и отсутствии МСК

Регистрируемая пролиферация на миелиновый Аг МОГ₁₋₁₂₅ отмечалась как у пациентов с РС, так и в контрольной группе сравнения. У пациентов с РС количество пролиферирующих CD3⁺45RO⁺ Т-лимфоцитов в ответ на рМОГ₁₋₁₂₅ статистически значимо превышало аналогичный показатель в группе сравнения (47,8 (27,2÷53,8)% и 24,9 (16,2÷30,2)% соответственно, *U-test*), в основном, за счет популяции CD8⁺CD45RO⁺ Т-клеток, где количество пролиферирующих клеток составило 57,8 (31,8÷78,7)% по сравнению с группой сравнения 30,0 (20,0÷57,9)%, *p*<0,05 (*U-test*). Добавление с культуры МСК приводило к статистически значимому ингибированию *in vitro* пролиферации миелин-стимулированных Т-лимфоцитов как у пациентов с РС, так и в группе сравнения.

Для характеристики степени выраженности ингибирующего влияния МСК на пролиферацию митоген-/миелин-стимулированных Т-клеток предложена формула расчета коэффициента супрессии пролиферативного ответа *k* (%):

$$K = 100 - \frac{П_{Тп+МСК} \times 100}{П_{Тп}},$$

где П_{Тп+МСК} – количество пролиферирующих Т-лимфоцитов в кокультуре МПК и МСК, стимулированных митогеном/антигеном, %; П_{Тп} – количество пролиферирующих Т-лимфоцитов, стимулированных митогеном/антигеном, %.

Коэффициенты супрессии МСК в отношении митоген-индуцированной пролиферации Т-клеток памяти пациентов с РС и группы сравнения статистически значимо не различались. Так, у пациентов с РС *k* CD3⁺CD45RO⁺

лимфоцитов составил 26,1 (16,3÷44,3)%, $CD4^+CD45RO^+$ лимфоцитов – 30,6 (20,6÷41,7)% и $CD8^+CD45RO^+$ клеток – 15,3% (3,4÷21,1%), а в группе сравнения – 25,7 (16,4÷40,3)%, 30,0 (21,0÷41,7)% и 15,6 (6,3÷24,3)% соответственно (*U-test*). При этом не выявлено статистически значимых отличий в коэффициентах супрессии $k_{CD3^+CD45RO^+}$ неспецифической пролиферации Т-лимфоцитов аллогенными (30,7 (20,0÷43,3)% и 25,7 (16,4÷40,3)%) и аутологичными (25,8 (15,8÷44,3)% и 21,1 (17,6÷34,2)%) МСК в группе пациентов с РС и здоровых доноров, соответственно. k рМОГ₁₋₁₂₅-индуцируемой пролиферации Т-клеток памяти пациентов с РС составили 47,5 (29,9÷74,1)% при аллогенном культивировании и 44,9 (26,3÷58,8)% при аутологичном, $p>0,05$ (*W-test*) и статистически значимо не отличались от анализируемых показателей группы сравнения (44,1 (29,3÷55,7)% и 47,6 (42,3÷55,5)% соответственно, *U-test*).

Отсутствие статистически значимых различий в способности аутологичных и аллогенных МСК ингибировать пролиферацию Т-клеток памяти пациентов с РС как при стимуляции МПК ФГА, так и рМОГ₁₋₁₂₅ явилось основанием для объединения данных, полученных при аллогенном и аутологичном культивировании. k пролиферации $CD3^+45RO^+$ Т-клеток при культивировании рМОГ₁₋₁₂₅ статистически значимо превышал анализируемый показатель при стимуляции клеток ФГА (47,0 (26,7÷73,1)% и 26,1 (16,3÷44,3)% соответственно, *W-test*). k миелин-специфической пролиферации обратно пропорционально коррелировал с *EDSS* пациентов с РС ($R_s = -0,53$, $p < 0,05$). МСК оказывали более выраженный супрессивный эффект на пролиферацию Т-лимфоцитов у пациентов с менее выраженной инвалидизацией по *EDSS*, что необходимо учитывать при отборе пациентов для трансплантации МСК.

Для оценки терапевтической эффективности аутологичных МСК у пациентов с РС предложены референтные значения коэффициентов супрессии k при *in vitro* кокультивировании с МСК (таблица 2).

Таблица 2. – Референтные значения коэффициентов супрессии k (%)

Коэффициент супрессии k (%)	Референтное значение
k антиген-неспецифической пролиферации (в ответ на ФГА)	$\geq 20,2$ %
k антиген-специфической пролиферации (в ответ на рМОГ ₁₋₁₂₅)	$\geq 41,3$ %

МСК, k которых находятся в пределах референтных значений, рекомендуются для клеточной терапии пациентов с РС.

Механизмы МСК-индуцируемой иммуносупрессии у пациентов с РС

Проведено дополнительное культивирование ФГА-/рМОГ₁₋₁₂₅-стимулированных МПК пациентов с РС (n=15) и здоровых лиц группы сравнения (n=9) не только в присутствии аутологичных-/аллогенных МСК, но и при добавлении супернатантов, полученных от конфлюэнтных интактных

культур МСК, а также от различных кокультур МПК и МСК. Супернатанты от интактных культур МСК не оказывали выраженного влияния на пролиферацию лимфоцитов независимо от типа используемого *in vitro* стимулятора клеточного деления, в то время как добавление в культуру супернатантов от кокультур митоген-/миелин-стимулированных МПК и МСК приводило к снижению количества пролиферирующих Т-клеток в обеих исследуемых группах. Коэффициенты МСК-опосредованной супрессии Т-клеточной пролиферации статистически значимо не отличались от аналогичных показателей, полученных для супернатантов кокультур в обеих исследуемых группах независимо от антигенного стимулятора (*W-test*).

Роль простагландина E₂ в МСК-индуцируемой иммуносупрессии. Конститутивная продукция ПГЕ₂ МСК пациентов с РС регистрировалась в незначительных количествах, не отличалась от показателей группы сравнения и составила 77,9 (37,8÷717,0) пг/мл и 91,8 (26,4÷321,0) пг/мл, $p > 0,05$, соответственно (*U-test*). При этом, по сравнению со спонтанной продукцией не отмечалось статистически значимых различий также в продукции ПГЕ₂ МПК пациентов с РС и группы сравнения, культивируемых как в присутствии ФГА и рМОГ, так и при добавлении супернатантов интактных культур МСК различных пассажей (рисунок 3). Добавление к МПК как аутологических, так и аллогенных МСК приводило к резкому увеличению продукции ПГЕ₂ независимо от условий культивирования. При этом более выраженная супрессия пролиферативного ответа наблюдалась в кокультурах МПК и МСК с высоким содержанием ПГЕ₂ в супернатантах клеточных культур ($R_s=0,47$, $p=0,049$), что подтверждает участие ПГЕ₂ в механизмах МСК-медирированной иммуносупрессии.

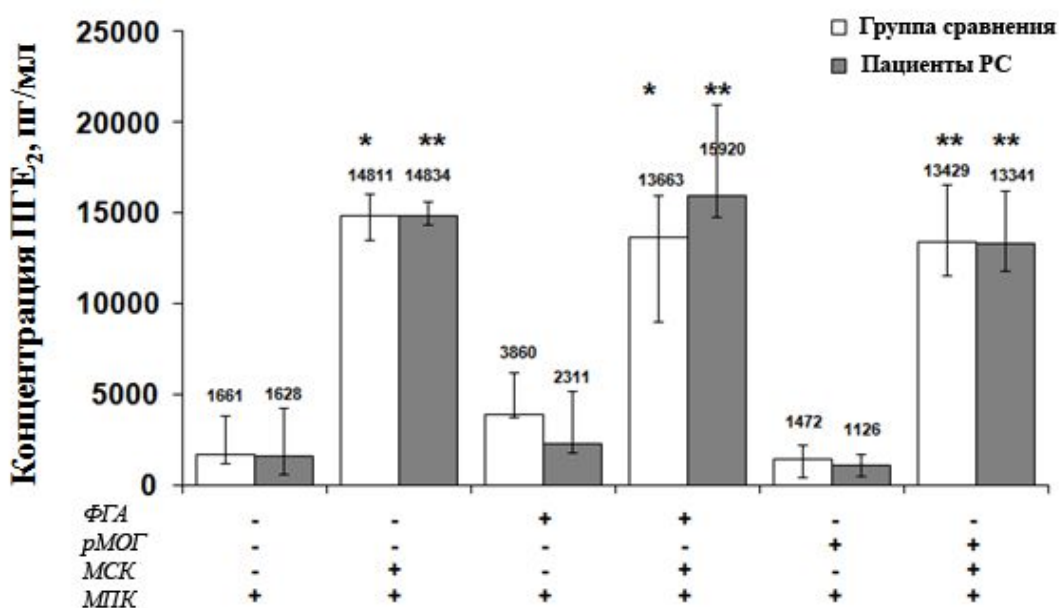


Рисунок 3. – Концентрация ПГЕ₂ в супернатантах клеточных культур

ИФН-гамма – индолеамин-диоксигеназный путь иммуносупрессии (ИФН γ -IDO-механизм иммуносупрессии). В интактных культурах МСК пациентов с РС конститутивная экспрессия IDO не определялась. В присутствии нестимулированных МПК МСК слабо экспрессировали IDO. Культивирование МСК с ФГА-активированными МПК пациентов с РС приводило к значительному увеличению экспрессии IDO. Для доказательства паракринного влияния провоспалительных факторов со стороны активированных лимфоцитов на экспрессию IDO в МСК проведено совместное культивирование клеточных культур с использованием полупроницаемой мембраны, разделяющей популяции МСК и ФГА-/pMOG₁₋₁₂₅-активированных МПК. МСК экспрессировали IDO на высоком уровне только при кокультивировании со стимулированными МПК, независимо от наличия межклеточного контакта.

В кокультурах нестимулированных МПК с МСК, экспрессирующими IDO на низком уровне, пролиферация CD4⁺ Т-лимфоцитов не наблюдалась. При митоген-индуцированной активации количество непролиферирующих CFSE^{hi} CD4⁺Т-лимфоцитов составило 33,6 (27,4÷49,6)%, тогда как в присутствии МСК, высоко экспрессирующими IDO, пролиферативная активность МПК снижалась, и количество CFSE^{hi} CD4⁺Т-клеток достигало 70,8 (52,4÷81,7)%, $p < 0,05$ (*W-test*). Супрессия пролиферативного ответа Т-лимфоцитов отмечалась только при их кокультивировании с МСК, экспрессирующими IDO на высоком уровне ($R_s = 0,63$, $p < 0,05$).

Концентрация ИФН- γ в супернатантах, полученных от нестимулированных культур МПК пациентов с РС, не отличалась от таковой культур нестимулированных МПК и МСК и составила 44,5 (36,6÷100,0) пг/мл и 67,6 (42,0÷124,2) пг/мл соответственно, $p > 0,05$ (*W-test*). Добавление в культуру МПК неспецифического митогена приводило к увеличению продукции ИФН- γ до 1778,7 (499,0÷1816,8) пг/мл, $p < 0,01$ (*W-test*). При кокультивировании ФГА-стимулированных МПК с МСК концентрация ИФН- γ снижалась до 704,1 (140,6÷1267,8) пг/мл, $p < 0,05$ по сравнению с концентрацией в культурах МПК, культивируемых в отсутствие МСК (*W-test*), что коррелировало с уровнем экспрессии IDO в МСК ($R_s = -0,6$; $p < 0,05$). Аналогичные результаты по МСК-опосредованной ингибции продукции ИФН- γ получены при кокультивировании pMOG-стимулированных МПК с МСК.

Воздействие ИФН- γ , опосредованное рецептором ИФН- γ 1 типа (IFNGR1, CD119), является необходимым условием для проявления иммунорегуляторных свойств МСК. Первичные культуры МСК пациентов с РС характеризовались высокой экспрессией CD119 – 99,3 (98,5÷99,4)%. Полученные результаты свидетельствуют о возможном связывании ИФН- γ со своим рецептором, что индуцирует внутриклеточную активацию экспрессии IDO в МСК.

В культурах пациентов с РС проведен анализ экспрессии CD119 на митоген-/миелин-стимулированных Т-лимфоцитах для определения возможного дополнительного биомаркера оценки иммуносупрессивного влияния культур МСК. Спонтанная экспрессия CD119 на CD3⁺ Т-лимфоцитах пациентов с РС, а также на CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ Т-клеточных субпопуляциях пациентов с РС составила 73,8 (66,6÷85,1)%, 74,8 (51,6÷78,7)% и 26,2 (17,5÷61,9)% соответственно. В ФГА-стимулированных культурах статистически значимое снижение CD119⁺CD3⁺ Т-лимфоцитов (45,8 (35,1÷66,3)%) установлено, в основном, за счет снижения количества CD119⁺CD4⁺ Т-клеток (44,5 (27,5÷59,2)%). Аналогичная тенденция наблюдалась в рМОГ-стимулированных Т-лимфоцитах. Добавление МСК в культуру МПК приводило к увеличению количества CD119-позитивных CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ клеток при митоген- и миелин-стимуляции МПК ($p < 0,01$ и $p < 0,05$ соответственно, *W-test*). При этом экспрессия CD119 на Т-лимфоцитах находилась в обратной зависимости от митоген-/миелин-индуцированной пролиферации анализируемых клеток ($R_s = -0,8$, $p < 0,001$, $R_s = -0,63$, $p < 0,05$ соответственно). Учитывая кинетику экспрессии ИФН- γ R1 в ходе клеточного цикла (up-регуляция перед входом в фазу S), повышение экспрессии CD119 на активированных Т-клетках вследствие кокультивирования с клеточными культурами дополнительно характеризует иммуносупрессивный потенциал МСК пациентов с РС.

Эффект клеточной терапии аутологичными МСК у пациентов с РС

Фенотипическая характеристика лимфоцитов пациентов с РС после клеточной терапии. У пациентов с РС в течение периода наблюдения не отмечалось статистически значимых различий в содержании лейкоцитов и лимфоцитов в периферической крови (*W-test*). Количество Т- и В-лимфоцитов статистически значимо не изменялось на протяжении 9–12 месяцев посттрансплантационного периода (*F-test*, *W-test*), что свидетельствует об отсутствии выраженного влияния клеточной терапии в отношении относительного количества основных популяций клеток адаптивного иммунитета (таблица 3).

К 10 дню после трансплантации статистически значимо снизилось количество CD3⁺, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих на мембране ранний активационный маркер CD25 с восстановлением исходного количества CD25-позитивных Т-лимфоцитов к 1 месяцу периода наблюдения. Наряду с этим, после клеточной терапии у пациентов с РС установлены статистически значимые различия в фенотипе лимфоцитов, характеризующие функциональные изменения клеток. Так, к 3 месяцу периода наблюдения количество циркулирующих Т-хелперов с фенотипом CD3⁺4⁺ снижалось одновременно с увеличением количества CD3⁺8⁺ Т-лимфоцитов ($p < 0,05$, *W-test*).

Таблица 3. – Динамика фенотипических маркеров лимфоцитов периферической крови пациентов с РС после клеточной терапии аутологичными МСК, *Me (25÷75)*

Фенотип лимфоцитов	Период наблюдения							P (F-test, W-test)
	До лечения	10 дней после лечения	1 мес. после лечения	3 мес. после лечения	6 мес. после лечения	9 мес. после лечения	1 год после лечения	
	1	2	3	4	5	6	7	
CD3 ⁺ , %	76,4 71,7÷78,6	74,1 71,1÷75,6	76,7 72,7÷79,1	76,7 72,8÷77,1	75,2 72,6÷78,3	71,7 70,2÷76,1	73,7 68,5÷76,7	ns
CD3 ⁺ , ×10 ⁹ /л	1,00 0,74÷1,60	0,90 0,86÷1,05	1,18 0,85÷1,86	1,17 0,87÷1,51	1,30 0,94÷1,53	1,21 0,74÷1,48	1,16 0,89÷1,38	ns
CD3 ⁺ 4 ⁺ , %	53,7 46,7÷64,7	47,3 43,7÷59,5	56,1 42,6÷59,6	49,5 43,2÷60,4	53,6 45,9÷64,6	53,2 51,2÷65,0	59,2 48,9÷64,1	p ₁₋₄ <0,05 p ₄₋₇ <0,05
CD3 ⁺ 4 ⁺ , ×10 ⁹ /л	0,49 0,44÷0,96	0,49 0,37÷0,61	0,70 0,52÷0,80	0,54 0,44÷0,68	0,74 0,50÷0,88	0,69 0,46÷0,83	0,60 0,57÷0,77	ns
CD3 ⁺ 8 ⁺ , %	38,2 29,4÷40,7	40,3 32,6÷48,8	39,2 31,0÷44,5	40,6 33,1÷48,1	36,5 32,2÷43,8	38,2 32,6÷42,6	37,2 33,0÷44,2	p ₁₋₄ <0,05 p ₄₋₅ <0,05
CD3 ⁺ 8 ⁺ , ×10 ⁹ /л	0,35 0,25÷0,61	0,38 0,27÷0,49	0,49 0,36÷0,75	0,43 0,34÷0,72	0,44 0,35÷0,61	0,39 0,27÷0,60	0,42 0,35÷0,54	p ₂₋₄ <0,05
CD3 ⁺ 4 ⁺ 8 ⁺	0,71 0,54÷1,43	0,96 0,51÷1,23	0,89 0,46÷1,50	1,28 0,70÷1,83	1,14 0,67÷2,31	1,14 0,63÷2,03	1,22 0,84÷3,04	p ₁₋₆ <0,05 p ₁₋₇ <0,05
CD19 ⁺ , %	7,6 6,3÷9,2	7,8 6,3÷9,3	7,7 5,2÷10,5	6,3 5,4÷7,1	8,9 7,1÷9,8	8,8 6,2÷12,9	7,8 6,9÷10,7	ns
CD19 ⁺ , ×10 ⁶ /л	99,2 75,8÷159,3	104,1 80,6÷151,8	140,0 72,8÷190,9	81,8 69,8÷108,5	137,7 86,0÷206,2	131,6 92,4÷190,4	148,3 85,6÷163,4	ns
CD3 ⁺ 56 ⁺ , %	12,9 11,1÷17,9	13,6 11,5÷29,9	13,0 10,8÷18,6	16,7 15,3÷22,7	13,5 11,3÷18,7	13,2 11,0÷18,0	13,4 12,3÷20,1	p ₁₋₄ <0,05
CD3 ⁺ 56 ⁺ , ×10 ⁶ /л	181,1 156,2÷240,9	184,8 179,1÷340,9	236,6 162,6÷328,7	278,3 212,0÷301,6	272,2 196,0÷348,0	224,1 148,0÷337,5	231,1 156,1÷329,2	ns
CD3 ⁺ 56 ⁺ , %	0,50 0,24÷3,22	1,09 0,35÷6,90	1,21 0,28÷3,08	1,25 0,72÷5,82	1,21 0,38÷3,15	0,82 0,56÷5,32	0,99 0,71÷4,12	p ₁₋₂ <0,05 p ₁₋₄ <0,01

Примечание – ns – статистически недостоверно.

Баланс CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток восстанавливался к 6 месяцу, и количество субпопуляций соответствовало уровню предтрансплантационного периода к 9–12 месяцам периода наблюдения. В то же время к 3 месяцу после клеточной терапии установлено статистически значимое увеличение количества CD56⁺ НК-клеток, коррелирующее с количеством трансплантированных МСК ($R_s=0,7$; $p<0,05$). Количество CD56⁺ НК-клеток увеличивалось, главным образом, за счет минорной субпопуляции CD3⁺56⁺ НКТ-клеток ($R_s=0,7$, $p<0,01$), процентное содержание которой статистически значимо увеличивалось к 3 месяцу после АТМСК и оставалось на повышенном уровне до 12 месяцев периода наблюдения.

Начиная с десятого дня после терапии, у пациентов с РС выявлена положительная динамика изменения количества популяции с потенциальной иммунорегуляторной функцией $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, которая сохранялась в течение 1 года после клеточной терапии. Количество $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов увеличилось с 2,05 (0,50÷3,84)% до 3,11 (0,88÷4,68)%, $p=0,036$, к 10 дню после клеточной терапии до 3,08 (2,07÷5,74)%, $p=0,021$, к 3 месяцам и 3,24 (0,72÷4,16)% – к 6 месяцу с постепенным снижением к 1 году периода наблюдения 2,61 (1,35÷ 3,91), $p=0,028$ (*F-test*, *W-test*).

Оценка нейропротекторного эффекта аутологичных МСК. Оценка нейропротекторного эффекта аутологичных МСК у пациентов с РС проводилась по данным ОКТ (оптическая когерентная томография) наряду с анализом концентраций сывороточного PDGF (тромбоцитарный фактор роста) и Ig G, M и A.

Концентрация PDGF в сыворотке крови пациентов с РС до проведения клеточной терапии не отличалась от аналогичного показателя группы сравнения и составила 1704,1 (1704,5÷2945,0) и 2034,6 (1746,3÷3216,05) пг/мл соответственно, $p>0,05$ (*U-test*).

Начиная с 10 дня после введения МСК отмечалось снижение концентрации ростового фактора в сыворотке крови пациентов с установлением статистически значимых различий к 1 и 3 месяцам после клеточной терапии (*F-test*, *W-test*).

Установлено статистически значимое увеличение сывороточной концентрации IgG и IgM к 1 месяцу посттрансплантационного периода с последующим восстановлением уровня иммуноглобулинов до исходного состояния к 6–9 месяцу наблюдения (*F-test*, *W-test*).

Через 1 месяц после клеточной терапии установлена сильная статистически значимая корреляция количества IgM в сыворотке крови пациентов с РС со степенью снижения концентрации PDGF ($R_s=0,87$; $p<0,05$) через 12 месяцев после инфузии МСК и обратная со степенью изменения СПНВ (слой периферических нервных волокон сетчатки) зрительного нерва

правого глаза ($R_s = -0,77$; $p = 0,05$) к 6 месяцу периода наблюдения. Кроме того, через 9 месяцев после АТМСК установлена корреляция концентрации IgM и степени изменения толщины волокон зрительных нервов обоих глаз ($R_s = -0,57$; $p = 0,04$). Выявлена сильная высокая значимая корреляционная взаимосвязь концентрации PDGF с процессами восстановления СПНВ у пациентов с РС через 1 год после клеточной терапии ($R_s = 0,75$, $p = 0,005$). Принимая во внимание способность МСК проникать через ГЭБ и мигрировать в очаги поражений, можно предположить, что МСК доставляют молекулы PDGF в зоны демиелинизации, способствуя восстановлению поврежденной нервной ткани за счет усиления пролиферации прогениторных клеток, а также их дифференцировки в зрелые олигодендроциты.

Цитокиновый профиль у пациентов с РС. У пациентов с РС МСК статистически значимо снижают *in vitro* миелин-специфическую продукцию провоспалительных цитокинов как Т-хелперного звена (ИФН- γ), так и моноцит-макрофагальной системы (ФНО- α) наряду с увеличением синтеза регуляторных цитокинов ТРФ- β и ИЛ-4 и тенденцией к увеличению ИЛ-10 (таблица 4).

Таблица 4. – Концентрация цитокинов в супернатантах клеточных культур пациентов с РС до проведения АТМСК, пг/мл, *Me* (25÷75)

Цито-кин	Неспецифическая стимуляция			Специфическая стимуляция			P (F-test, W-test)
	спонтанная	ФГА	ФГА+МСК	спонтанная	рМОГ	рМОГ+МСК	
	1	2	3	4	5	6	
γ -ИФН	38,0 (27,8÷928,9)	581,4 (293,6÷2760,1)	113,1 (90,4÷1790,0)	102,7 (68,2÷1742,8)	310,8 (99,7÷1957,1)	68,8 (26,4÷543,4)	$p_{1-2}=0,04$ $p_{2-3}=0,06$ $p_{5-6}=0,01$ $p_{4-6}=0,06$
ФНО- α	48,8 (38,5÷461,6)	603,1 (554,7÷921,5)	325,1 (217,3÷459,7)	167,1 (103,8÷450,2)	178,8 (136,8÷524,4)	70,1 (53,0÷168,6)	$p_{1-2}=0,04$ $p_{2-3}=0,04$ $p_{5-6}=0,04$ $p_{4-6}=0,04$
ИЛ-10	259,1 (139,3÷379,0)	393,2 (113,1÷673,3)	479,3 (170,7÷788,0)	185,6 (142,6÷228,6)	165,2 (153,6÷176,8)	254,0 (224,8÷283,3)	$p_{2-3}=0,06$ $p_{1-3}=0,06$ $p_{5-6}=0,06$
ТРФ- β	247,0 (192,0÷279,0)	369,5 (239,0÷404,0)	376,0 (348,0÷398,0)	271,0 (155,0÷296,0)	212,5 (161,0÷288,0)	301,0 (276,0÷350,0)	$p_{1-2}=0,02$ $p_{1-3}=0,02$ $p_{5-6}=0,04$

Примечания

1. спонтанная – продукция цитокинов МПК без стимуляции.
2. ФГА – продукция цитокинов МПК при стимуляции ФГА.
3. ФГА+МСК – продукция цитокинов МПК при стимуляции ФГА в присутствии МСК.
4. рМОГ – продукция цитокинов МПК при стимуляции рМОГ.
5. рМОГ+МСК – продукция цитокинов МПК при стимуляции рМОГ в присутствии МСК.

После клеточной терапии у пациентов с РС на 10 день регистрировалось кратковременное повышение способности миелин-стимулированных МПК

синтезировать ИФН- γ , уровень которого статистически значимо снижался к 6–12 месяцам после клеточной терапии. Аналогичная динамика миелин-индуцированного синтеза наблюдалась у пациентов с РС и в отношении ФНО- α и ИЛ-10. К 3–6 месяцам посттрансплантационного периода концентрация цитокинов снижалась до уровня, сопоставимого с миелин-специфическим синтезом ИФН- γ , ФНО- α и ИЛ-10 МПК в присутствии МСК *in vitro*. К 12 месяцам после клеточной терапии количество CD3⁺T-лимфоцитов, продуцирующих ИФН- γ , статистически значимо снижалось в сочетании с повышением количества лимфоцитов, продуцирующих ИЛ-4.

Наряду с этим, в срок до 6–9 месяцев периода наблюдения отсутствовали изменения в динамике митоген-индуцированного синтеза провоспалительных цитокинов, что свидетельствует об отсутствии выраженного супрессивного влияния клеточной терапии на продукцию провоспалительных цитокинов в условиях неспецифической стимуляции у пациентов с РС и характеризует функциональную состоятельность МПК.

Методологический подход к оценке иммуномодулирующего действия клеточной терапии у пациентов с РС

Исходя из патогенеза заболевания, полученных результатов анализа ингибиторного действия МСК при *in vitro* исследованиях и возможных механизмов регуляторного действия МСК, для оценки иммуномодулирующего эффекта клеточной терапии у пациентов с РС после клеточной терапии аутологичными МСК предложены следующие показатели: а) количество циркулирующих Т-клеток памяти; б) количество CD119-позитивных Т-лимфоцитов; в) пролиферативный ответ Т-лимфоцитов в присутствии неспецифического митогена (ФГА) и специфического миелинового антигена (pMOG₁₋₁₂₅) с определением *k* пролиферации Т-лимфоцитов клеточными культурами.

У пациентов через 10 дней после инфузии МСК установлено статистически значимое снижение CD3⁺45RO⁺ лимфоцитов, в основном, за счет снижения CD4⁺45RO⁺ Т-клеток. Выявленная тенденция сохранялась на протяжении 9–12 месяцев периода наблюдения. В условиях *in vitro* митоген-/миелин-индуцируемой стимуляции лимфоцитов к 6 месяцам после клеточной терапии у пациентов с РС выявлено статистически значимое снижение пролиферации Т-лимфоцитов при стимуляции специфическим антигеном. Экспрессия CD119 на Т-лимфоцитах зависела от количества пролиферирующих CD3⁺119⁺ клеток ($R_s = -0,44$, $p < 0,001$). Кроме того, к 9 месяцу после трансплантации установлена прямая сильная корреляционная связь между количеством CD3⁺119⁺ лимфоцитов и *k* пролиферации CD3⁺ лимфоцитов при стимуляции pMOG ($R_s = 0,9$, $p < 0,05$). Выявленная тенденция

характерна как для CD4⁺, так и, в большей степени, для CD8⁺ Т-клеток, и сохранялась на протяжении 12 месяцев периода наблюдения.

Для подтверждения установленного факта индукции МСК-опосредованной супрессии проведен анализ *k* ФГА- и рМОГ-стимулированной пролиферации Т-лимфоцитов у пациентов с РС после АТМСК. После клеточной терапии не наблюдалось выраженного ингибирования неспецифической пролиферации Т-лимфоцитов, характеризующей общее функциональное состояние клеток, что выражалось в низких *k* в течение 12 месяцев после терапии, и анализируемый показатель не достигал величины при исследовании *in vitro* ($k_{\text{ФГА 1 год}} = 17,6\%$, $k_{\text{ФГА in vitro}} = 39,1\%$, $p=0,036$, соответственно, *W-test*). При анализе специфической пролиферации Т-лимфоцитов пациентов с РС после клеточной терапии установлено статистически значимое увеличение коэффициента супрессии к 6–9 месяцам периода наблюдения до величины *k* 1 году после трансплантации, полученной при *in vitro* исследовании ($k_{\text{рМОГ 1 год}} = 48,5\%$, $k_{\text{рМОГ in vitro}} = 52,2\%$, $p=0,61$, соответственно, *W-test*).

Для установления диагностической значимости иммунологических показателей в прогнозе клинической эффективности лечения РС с использованием клеточной терапии проведен ROC-анализ, результаты которого представлены в таблице 5.

Таблица 5. – Диагностическая ценность коэффициентов МСК-опосредованной супрессии миелин/митоген-индуцированной пролиферации Т-лимфоцитов (*k*) в прогнозе клинической эффективности лечения РС с использованием АТМСК

Показатель	AUROC	95% ДИ	<i>P</i>	Чувствительность, %	Специфичность, %
Исследования <i>in vitro</i> до клеточной терапии					
$k_{\text{рМОГ CD4}^+\text{CD45RO}^+}$	0,88	0,55–0,99	0,001	75,0	100,0
$k_{\text{ФГА CD3}^+\text{CD45RO}^+}$	0,81	0,50–0,97	0,016	77,8	100,0
Исследования <i>in vitro</i> после клеточной терапии					
$k_{\text{рМОГ CD3}^+\text{CD45RO}^+}$ 3 мес. после терапии	0,93	0,54–0,99	< 0,0001	80,0	100,0
$k_{\text{рМОГ CD3}^+\text{CD45RO}^+}$ 1 год после терапии	0,87	0,46–0,99	0,019	100,0	66,7
$k_{\text{рМОГ CD4}^+\text{CD45RO}^+}$ 3 мес. после терапии	0,87	0,46–0,99	0,019	100,0	66,7
$k_{\text{рМОГ CD4}^+\text{CD45RO}^+}$ 6 мес. после терапии	0,93	0,54–0,99	< 0,0001	80,0	100,0
$k_{\text{рМОГ CD4}^+\text{CD45RO}^+}$ 1 год после терапии	1,0	0,63–1,00	< 0,0001	100,0	100,0

Специфичность и чувствительность используемых показателей варьировали от 67 до 100%, что свидетельствует о высокой диагностической ценности коэффициентов супрессии МСК миелин-специфической пролиферации Т-лимфоцитов с фенотипом CD45RO клеток памяти и позволяет

сделать прогноз по поводу ожидаемой клинической эффективности клеточной иммунотерапии с использованием аутологичных МСК *in vitro* до проведения лечения.

Общий среднегодовой экономический эффект от внедрения Инструкции по применению № 147-1113 от 27.12.2013 г. «Метод клеточной терапии рассеянного склероза» из расчета на 1 пациента составил 107 404 176,8 бел. руб. ($\approx 5370,2$ долларов США) по состоянию на декабрь 2015 г.

Предложенная методика является импортозамещающим методом лечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. МСК пациентов с РС на протяжении 4 пассажей экспрессируют поверхностные маркеры CD90, CD105 и CD44 при отсутствии CD34, CD31, CD45, CD14), а также ряд молекул, принимающих участие в иммунных реакциях (CD119 (98,5 (97,6÷99,3)%) и CCR7 (88,7 (87,7÷91,0)%) – первичная культура), сохраняют полипотентность на протяжении изученных пассажей и не отличаются от клеточных культур, полученных от здоровых лиц, по своим морфологическим, фенотипическим и функциональным особенностям [9, 15, 16, 24].

МСК человека конститутивно экспрессируют нестин, но не экспрессируют маркер зрелых нервных клеток GFAP. Оптимальным для индукции нестина является культивирование МСК в течение 3 дней в культуральной среде с содержанием 1% сыворотки, что позволяет оценить нейрогенный потенциал клеточных культур [6, 12, 26, 27].

2. Культуры МСК 1–2-го пассажей здоровых крыс статистически значимо снижают Кона-индуцированную пролиферацию спленоцитов при клеточном соотношении 1:10. При добавлении коктейля синтетических пептидов миелиновых антигенов спленоциты здоровых крыс отвечают повышенной пролиферацией *in vitro* ($p < 0,05$, *W-test*) по отношению к спонтанной пролиферации. Присутствие МСК 1–4-го пассажей крыс с ЭАЭ, как и крыс группы сравнения подавляет *in vitro* антиген-специфическую пролиферацию спленоцитов на 20–55% ($p < 0,05$, *W-test*) [5, 8, 10, 22, 25, 28, 29, 39, 40, 42, 45].

3. Фенотип лимфоцитов периферической крови пациентов с РС свидетельствует об усилении цитотоксического потенциала со стороны минорных популяций Т-клеток, что обусловлено повышением у пациентов по сравнению с контрольной группой абсолютного количества «двойных негативных» Т-лимфоцитов с фенотипом CD3⁺4⁻8⁻ (99,2 (67,5÷150,7)%) и 77,6 (62,7÷105,3)%, $p = 0,026$, соответственно, *U-test*), НКТ-клеток с фенотипом CD3⁺56⁺ (11,0 (3,36÷30,8)%) и 6,0 (2,14÷10,4)%, $p = 0,015$, соответственно, *U-test*) наряду со статистически значимым снижением

относительного количества Т-лимфоцитов с $\gamma\delta$ ТКР (2,38 (1,2÷3,9)% и 3,22 (1,95÷6,9)%, $p=0,025$, соответственно, *U-test*). Отсутствие статистически значимых различий как в относительном, так и в абсолютном количестве основных популяций лимфоцитов у пациентов с РС в сочетании с увеличением количества эффекторных $CD3^+45RO^+CCR7^-$ Т-клеток памяти (17,0 (14,5÷20,5)% у пациентов с РС и 13,7 (8,9÷15,4)% в группе сравнения, $p<0,05$, *U-test*), коррелирующее с общим количеством Т-клеток памяти ($R_s=0,76$, $p<0,01$) и количеством активированных $CD25^+$ Т-лимфоцитов ($R_s=0,57$, $p<0,05$), свидетельствует о поляризации Т-лимфоцитов пациентов с РС в отношении реализации эффекторных реакций специфического иммунного ответа [1, 2, 4, 7, 17, 36, 50, 54].

Неспецифическая *in vitro* пролиферация Т-лимфоцитов периферической крови пациентов с РС статистически значимо не отличается от аналогичных показателей лимфоцитов здоровых лиц группы сравнения. Повышение количества пролиферирующих лимфоцитов при стимуляции специфическим миелиновым Аг (количество $CD4^+45RO^+$ Т-клеток при стимуляции рМОГ₁₋₁₂₅ составило 44,8 (34,9÷51,6)% у пациентов с РС и 25,1 (14,6÷40,4)% в группе сравнения, $p<0,05$, *U-test*; количество $CD8^+45RO^+$ составило 57,7 (31,8÷78,7)% и 30,0 (20,0÷57,9)%, $p<0,05$, соответственно, *U-test*) характеризует участие миелин-специфических эффекторных Т-клеток в патогенезе РС [1, 3, 11, 14, 23, 34, 38, 41, 61].

4. Аутологичные и аллогенные МСК ранних пассажей ингибируют неспецифическую и миелин-индуцированную пролиферацию Т-клеток памяти пациентов с РС (коэффициенты супрессии ФГА-индуцируемой пролиферации составляют 30,7 (20,0÷43,3)% при аллогенном культивировании и 25,8 (15,8÷44,3)% при аутологичном, $p>0,05$, *W-test*; коэффициенты супрессии рМОГ₁₋₁₂₅-индуцируемой пролиферации составляют 47,5 (29,9÷74,1)% при аллогенном культивировании и 44,9 (26,3÷58,8)% при аутологичном, $p>0,05$, *W-test*) и статистически значимо не отличаются от аналогичных показателей группы сравнения (*U-test*). Уровень супрессивного действия МСК на миелин-индуцированную пролиферацию Т-лимфоцитов превышает аналогичный показатель по отношению к митоген-стимулированной пролиферации (47,0 (26,7÷73,1)% и 26,1 (16,3÷44,3)%, $p<0,01$ соответственно, *W-test*) и коррелирует со степенью выраженности неврологического дефицита пациентов с РС ($R_s=-0,53$, $p<0,05$) [1, 11, 13, 16, 18, 31, 41, 51, 55, 56, 59].

Количество $CD45RO$ -позитивных Т-лимфоцитов снижается при *in vitro* совместном культивировании с МСК ($p=0,002$, *W-test*) в сочетании с повышением $CD119$ -позитивных Т-клеток ($p=0,002$, *W-test*). Экспрессия $CD45RO$ и $CD119$ на мембране Т-лимфоцитов зависит от пролиферации активированных лимфоцитов ($R_s=0,75$, $p<0,001$ – количество $CD45RO$ -

позитивных Т-лимфоцитов и пролиферация Т-лимфоцитов и $R_s = -0,65$, $p < 0,01$ – количество CD119-позитивных Т-лимфоцитов и пролиферация Т-лимфоцитов), отражает функциональное состояние клетки и характеризует антипролиферативный эффект МСК. Референтные значения коэффициентов *in vitro* МСК-опосредованной супрессии антиген-неспецифической и антиген-специфической пролиферации CD3⁺CD45RO⁺ Т-клеток памяти $k(\%)$ ($\geq 20,2\%$ при стимуляции лимфоцитов ФГА и $\geq 41,3\%$ при стимуляции лимфоцитов рМОГ₁₋₁₂₅) и индексов изменения количества CD3⁺CD119⁺ Т-клеток $I_{CD119}(\%)$ при совместном культивировании с МСК ($> 29,6\%$ при ФГА стимуляции и $> 23,4\%$ при рМОГ₁₋₁₂₅ стимуляции) характеризуют иммунорегуляторный потенциал МСК в прогнозе эффективности клеточной терапии [16, 17, 18, 21, 30, 46, 55, 56, 57, 59, 60].

5. Супернатанты интактных культур МСК пациентов с РС и группы сравнения не влияют на неспецифическую ($p > 0,05$, *W-test*) и миелин-индуцированную ($p > 0,05$, *W-test*) пролиферацию Т-лимфоцитов. Добавление как аутологичных, так и аллогенных МСК к МПК приводит к статистически значимому увеличению продукции ПГЕ₂ независимо от типа клеточного стимулятора, что свидетельствует о необходимости клеточного контакта в реализации иммунорегуляторного потенциала МСК. При этом супернатанты от кокультур МПК и МСК оказывают выраженное ингибирующее влияние на пролиферативный ответ Т-лимфоцитов, сопоставимый с иммуносупрессивным действием МСК в отношении как митоген- ($\kappa_{с/н(МПК+МСК)} = 36,9$ ($28,3 \div 42,7$)%, $\kappa_{МСК} = 43,3$ ($26,3 \div 63,5$)%), $p > 0,05$, *W-test*, так и миелин-индуцированной ($\kappa_{с/н(МПК+МСК)} = 56,7$ ($36,1 \div 59,9$)%, $\kappa_{МСК} = 67,6$ ($62,7 \div 80,0$)%, $p > 0,05$, *W-test*) пролиферации Т-лимфоцитов, коррелируя с концентрацией ПГЕ₂ ($R_s = 0,41$, $p = 0,03$) [1, 13, 14, 43, 44].

ИНФ- γ *in vitro* праймирует МСК пациентов с РС для проявления ими иммунорегуляторных свойств вследствие регуляции IDO в МСК, что подтверждается увеличением экспрессии IDO при кокультивировании с МСК как при непосредственном контакте с митоген-активированными МПК, так и в условиях отсутствия межклеточного контакта. Концентрация ИНФ- γ снижается при кокультивировании ФГА-стимулированных МПК с МСК по сравнению с концентрацией в культурах МПК, культивируемых в отсутствие МСК (704,1 ($140,6 \div 1267,8$) пг/мл и 1778,7 ($499,0 \div 1816,8$) пг/мл соответственно, $p < 0,01$, *W-test*), что коррелирует с уровнем экспрессии IDO в МСК ($R_s = -0,6$; $p < 0,05$). Супрессия пролиферативного ответа Т-лимфоцитов отмечается при совместном культивировании с МСК, экспрессирующими IDO на высоком уровне ($R_s = 0,63$, $p < 0,05$) [13, 16, 46, 61].

6. Введение аутологичных МСК не приводит к статистически значимым изменениям в количестве лейкоцитов, лимфоцитов периферической крови, Т-

и В-клеток пациентов с РС по сравнению с периодом до проведения клеточной терапии ($p > 0,05$, *F-test*, *W-test*). В период с 10 дней до 3 месяцев после трансплантации установлено повышение относительного количества $CD3^+56^+$ НК-клеток (12,9 (11,1÷17,91)% и 6,7 (15,3÷22,7)%, $p < 0,05$) за счет повышения $CD3^+56^+$ НКТ-клеток (0,50 (0,24÷3,22)% и 1,25 (0,72÷5,82)%, $p < 0,01$, *W-test*) и увеличение $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов (2,05 (0,50÷3,84)% и 3,08 (2,07÷5,74)%, $p = 0,021$, *W-test*). Через 3 месяца после клеточной терапии наблюдается инверсия Т-лимфоцитов, характеризующаяся снижением $CD3^+4^+$ субпопуляции (53,7 (46,7÷64,7)% и 49,5 (43,2÷60,4)%, $p < 0,05$, *W-test*) и повышением $CD3^+8^+$ клеток (38,2 (29,4÷40,7)% и 40,6 (33,1÷48,1)%, $p < 0,05$, *W-test*) наряду со статистически значимым снижением концентрации ИФН- γ и ФНО- α в супернатантах миелин-стимулированных МПК пациентов с РС через 3–6 месяцев после клеточной терапии аутологичными МСК (*F-test*, *W-test*) [1, 19, 21, 30, 36, 47, 50, 52, 53].

До проведения клеточной терапии *in vitro* продукция ИФН- γ , ФНО- α и ИЛ-10 МПК пациентов с РС статистически значимо увеличивается при поликлональной стимуляции (38,0 (27,8÷928,9) и 581,4 (293,6÷2760,1) пг/мл, $p = 0,04$; 48,8 (38,5÷461,6) и 603,1 (554,7÷921,5) пг/мл, $p = 0,04$; 247,0 (192,0÷279,0) и 369,5 (239,0÷404,0) пг/мл, $p = 0,02$, соответственно, *W-test*) и не ингибируется после введения аутологичных МСК ($p > 0,05$, *W-test*) [19, 33, 49].

7. Начиная с десятого дня после клеточной терапии, в сыворотке крови пациентов с РС снижается концентрация PDGF с установлением статистически значимых различий к 1–3 месяцам периода наблюдения (1704 (1051÷2934) пг/мл до трансплантации, 844 (572÷1031) пг/мл спустя 1 месяц после трансплантации, 796 (728÷1561) пг/мл спустя 3 месяца после трансплантации, соответственно, *F-test*, *W-test*). Степень снижения концентрации PDGF коррелирует с процессами восстановления СПНВ у пациентов с РС через 1 год после клеточной терапии ($R_s = 0,75$, $p = 0,005$).

Сывороточная концентрация IgG и IgM у пациентов с РС статистически значимо увеличивается через 1 месяц после введения аутологичных МСК (11,5 (10,9÷14,2) г/л и 17,8 (15,7÷21,7) г/л; 2,08 (1,48÷2,34) и 2,55 (1,94÷3,20) г/л, соответственно) с последующим восстановлением исходного уровня иммуноглобулинов к 6–9 месяцу наблюдения ($p > 0,05$, *F-test*, *W-test*). Количество IgM в сыворотке крови пациентов с РС коррелирует со степенью снижения концентрации PDGF ($R_s = 0,87$; $p < 0,05$) и изменением толщины волокна зрительного нерва правого глаза ($R_s = -0,77$; $p = 0,05$) к 6 месяцу и толщины волокон зрительных нервов обоих глаз ($R_s = -0,57$; $p = 0,04$) к 9 месяцу после клеточной терапии [20, 32, 35, 37, 48, 51, 52].

8. У пациентов с РС на десятые сутки после клеточной терапии аутологичными МСК по сравнению с периодом до лечения снижается

количество циркулирующих эффекторных $CD3^+45RO^+$ лимфоцитов (28,1 (2,6÷37,6) и 24,0 (18,6÷36,9) соответственно, $p=0,028$, *W-test*). Выявленная тенденция сохраняется на протяжении 9–12 месяцев периода наблюдения ($p=0,017$, *F-test*, *W-test*). Супрессия миелин-специфической пролиферации Т-лимфоцитов после терапии достигает уровня предтрансплантационного *in vitro* исследования к 1 году периода наблюдения ($k_{pMOG\ 1\ год} = 48,5\%$, $k_{pMOG\ in\ vitro} = 52,2\%$, $p=0,61$, соответственно, *F-test*, *W-test*), что позволяет предположить определенное *in vivo* селективное действие МСК на пролиферацию миелин-специфических Т-лимфоцитов. При этом МСК не снижают уровень неспецифической защиты и обладают пластичностью по отношению к иммунной системе пациентов с РС, что выражается в низких коэффициентах супрессии ФГА-стимулированной пролиферации Т-лимфоцитов в течение 12 месяцев после клеточной терапии, и анализируемый показатель не достигает *in vitro* величины до лечения ($k_{ФГА\ 1\ год} = 17,6\%$, $k_{ФГА\ in\ vitro} = 39,1\%$, $p=0,036$, соответственно, *F-test*, *W-test*) [1, 18, 21, 30, 31, 32].

Прогностическая ценность *in vitro* модели совместного культивирования МСК и лимфоцитов для *in vivo* оценки иммуномодулирующего действия клеточной терапии у пациентов с РС с использованием коэффициентов МСК-индуцированной супрессии миелин-стимулированной пролиферации Т-лимфоцитов и индексов изменения количества $CD3^+CD119^+$ клеток определена расчетами площади под ROC-кривой (AUROC (95% ДИ)) и составляет: до терапии: $k_{pMOG\ CD4^+CD45RO^+} = 0,88$ (0,55–0,99), $p=0,001$ и $I_{CD119\ pMOG\ CD3^+} = 1,0$ (0,72–1,00), $p<0,0001$; после терапии: $k_{pMOG\ CD3^+CD45RO^+}$ через 3 мес. – 0,93 (0,54–0,99), $p<0,0001$ и $k_{pMOG\ CD3^+CD45RO^+}$ через 1 год – 0,87 (0,46–0,99), $p=0,019$. Специфичность и чувствительность используемых показателей варьирует от 67 до 100%, что характерно для высокой диагностической ценности предложенных иммунологических критериев в прогнозе терапевтической эффективности клеточной иммунотерапии РС аутологичными МСК [1, 21, 58, 60].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Метод клеточной терапии аутологичными МСК, обладающими выраженным иммуномодулирующим потенциалом, рекомендуется для внедрения в профильные отделения лечебных учреждений Министерства здравоохранения Республики Беларусь с целью повышения эффективности патогенетического лечения болезней [55, 56, 57, 58] (акты внедрения от 26.05.2014, 20.11.2014, 16.04.2015, 09.11.2015 и от 28.12.2015, УЗ «9-я ГКБ» г. Минска).

2. Оценка иммуномодулирующих свойств МСК позволит использовать клеточные культуры в патогенетической терапии РС, усовершенствовать

критерии отбора пациентов, персонифицировать терапию и повысить уровень клиничко-лабораторных и научных исследований. При получении *in vitro* коэффициентов супрессии клеточными культурами ФГА- и рМОГ₁₋₁₂₅-индуцированной пролиферации Т-клеток памяти пациентов с РС в пределах референтных значений ($k \geq 20,2$ % для антиген-неспецифической пролиферации и $k \geq 41,3$ % для миелин-специфической пролиферации) целесообразно проведение клеточной иммунотерапии пациентам с РС с низким уровнем неврологического дефицита в виде внутривенной инфузии аутологичных МСК в концентрации 1–2 млн клеток на кг массы тела [59, 60].

3. Внедрение методологии оценки иммуномодулирующего действия клеточной терапии у пациентов с РС, основанной на определении миелин-стимулированной пролиферации Т-лимфоцитов и изменении поверхностного фенотипа клеток после инфузии аутологичных МСК, в учебный процесс высших учреждений образования, осуществляющих подготовку специалистов медико-биологического профиля в области иммунологии, нейроиммунологии, неврологии, клинической лабораторной диагностики и клеточных биотехнологий (акты внедрения от 12.01.2009, кафедра клинической лабораторной диагностики БелМАПО; от 17.09.2013 и 15.09.2014, кафедра иммунологии МГЭУ им. А. Д. Сахарова; от 26.05.2014, кафедра нервных и нейрохирургических болезней БГМУ).

4. Цитофлуориметрический метод мониторинга количественного анализа клеточного деления, основанный на применении внутриклеточного флуоресцентного красителя 5-(и-6)-карбоксифлуоресцеин диацетат сукцинимидил эфира следует использовать в деятельности профильных иммунологических лабораторий для оценки иммуномодулирующих свойств МСК и подготовки оптимального клеточного трансплантата для достижения максимального терапевтического эффекта [23] (акты внедрения от 28.09.2012, УЗ «9-я ГКБ» г. Минска; от 10.09.2013, РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии).

5. Методологический подход к оценке прогноза клинической эффективности клеточной терапии аутологичными МСК пациентов с РС и результаты клиничко-иммунологического мониторинга пациентов после клеточной терапии позволяют установить сроки повторной трансплантации МСК через 9–12 месяцев после первичной инфузии и открывают перспективы применения аллогенных культур в клеточной терапии РС [1, 21].

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА**Монографии**

1. Зафранская, М. М. Эффект мезенхимальных стволовых клеток при клеточной терапии рассеянного склероза / М. М. Зафранская, А. С. Федулов, Ю. Е. Демидчик. – Минск : Беларус. навука, 2016. – 213 с.

Статьи в рецензируемых научных журналах

2. Нижегородова, Д. Б. Современные аспекты иммунопатогенеза рассеянного склероза / Д. Б. Нижегородова, М. Эберл, М. М. Зафранская // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2005. – № 4. – С. 3–6.

3. IFN-beta therapy reduces CD4⁺ and CD8⁺ memory T cell autoreactivity in multiple sclerosis / M. Zafranskaya, P. Oschmann, R. Engel, A. Weishaupt, J. M. van Noort, H. Jomaa, M. Eberl // Immunology. – 2007. – Vol. 121, № 1. – P. 29–39.

4. Нижегородова, Д. Б. $\gamma\delta$ T-лимфоциты: общая характеристика, субпопуляционный состав, биологическая роль и функциональные особенности / Д. Б. Нижегородова, М. М. Зафранская // Мед. иммунология. – 2009. – Т. 11, № 2/3. – С. 115–130.

5. Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит и функциональная характеристика Т-лимфоцитов / Д. Б. Нижегородова, М. Ю. Колобова, С. С. Багатка, Г. И. Иванчик, Я. М. Мотузова, М. М. Зафранская // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2009. – № 3. – С. 75–81.

6. Условия нейтральной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток *in vitro* для изучения влияния их трансплантации при демиелинизирующих заболеваниях центральной нервной системы / И. В. Пыко, Я. М. Мотузова, А. С. Федулов, С. А. Гузов, Д. Б. Нижегородова, М. М. Зафранская, З. Б. Квачева // Клеточные культуры: информ. бюл. – СПб., 2009. – Вып. 24. – С. 52–56.

7. Функциональная характеристика $\gamma\delta$ T-лимфоцитов у больных рассеянным склерозом / М. М. Зафранская, Д. Б. Нижегородова, Г. Я. Хулуп, А. С. Федулов // Мед. журн. – 2009. – № 2. – С. 47–51.

8. Эффективность и безопасность трансплантации стволовых клеток на модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита / Я. М. Мотузова, А. С. Федулов, М. М. Зафранская, Д. Б. Нижегородова, С. А. Гузов, С. С. Багатка, М. Ю. Юркевич, М. А. Шпаковская // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2010. – № 4. – С. 38–45.

9. Морфология, кинетика роста и фенотип мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и жировой ткани человека / М. М. Зафранская, Н. В. Ламовская, Д. Б. Нижегородова, М. Ю. Юркевич, С. С. Багатка,

С. Ю. Мечковский, Г. И. Иванчик // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2010. – № 4. – С. 86–93.

10. Иммуносупрессивный потенциал мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани крыс с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом при ко-культивировании с митоген/миелин-стимулированными спленоцитами / М. М. Зафранская, Д. Б. Нижегородова, М. Ю. Колобова, С. С. Багатка, Г. И. Иванчик, Е. А. Петрова, Н. В. Ламовская // Медицина. – 2010. – № 3. – С. 85–88.

11. Влияние мезенхимальных стволовых клеток на пролиферацию Т-клеток памяти у пациентов с рассеянным склерозом / М. М. Зафранская, А. С. Федулов, Д. Б. Нижегородова, Я. М. Мотузова, М. Ю. Юркевич, С. С. Багатка, Н. Ф. Миланович // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2010. – № 3. – С. 24–31.

12. Экспрессия невральных маркеров нестина и GFAP в мезенхимальных стволовых клетках костного мозга и жировой ткани человека / М. Ю. Юркевич, М. М. Зафранская, С. С. Багатка, Д. Б. Нижегородова, Я. М. Мотузова, А. С. Федулов, Ю. Ф. Хитро // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2011. – № 3. – С. 79–83.

13. Механизмы антипролиферативного действия мезенхимальных стволовых клеток у пациентов с рассеянным склерозом / М. М. Зафранская, Д. Б. Нижегородова, М. Ю. Юркевич, С. С. Багатка, Г. И. Иванчик, Я. М. Мотузова, А. С. Федулов // Мед. иммунология. – 2011. – Т. 13, № 2/3. – С. 237–246.

14. PGE2 contributes to *in vitro* MSC-mediated inhibition of non-specific- and antigen-specific T cells proliferation in MS patients / M. Zafranskaya, D. Nizheharodava, M. Yurkevich, G. Ivanchik, Y. Demidchik, N. Kozhukh, A. Fedulov // Scand. J. Immunol. – 2013. – Vol. 78, № 5. – P. 455–462.

15. Сравнительная характеристика иммуномодулирующих свойств мультипотентных мезенхимных стромальных клеток и фибробластов человека / М. М. Зафранская, В. Г. Богдан, Ю. Е. Демидчик, Ю. М. Гаин, С. С. Багатка, С. Е. Шелкович, Г. И. Иванчик // Клеточ. трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Т. VIII, № 1. – С. 1–7.

16. *In vitro* assessment of mesenchymal stem cells immunosuppressive potential in multiple sclerosis patients / M. M. Zafranskaya, D. B. Nizheharodova, M. Y. Yurkevich, N. V. Lamouskaya, Y. M. Motuzova, S. S. Bagatka, H. I. Ivanchik, A. S. Fedulov // Immunol. Lett. – 2013. – Vol. 149, № 1/2. – P. 9–18.

17. Количественная динамика Т-клеток памяти у пациентов с рассеянным склерозом после аутологичной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток / М. М. Зафранская, А. С. Федулов, Я. М. Мотузова, Е. Б. Рудаковская, М. Ю. Юркевич, С. И. Кривенко, Д. Б. Нижегородова, С. С. Багатка,

А. В. Борисов, И. В. Свирид, Ю. Е. Демидчик // Медицина. – 2013. – № 3. – С. 47–53.

18. Методологический подход к оценке иммуномодулирующего действия клеточной терапии у пациентов с рассеянным склерозом после аутологичной трансплантации мезенхимальных/стромальных стволовых клеток / М. М. Зафранская, А. С. Федулов, Д. Б. Нижегородова, С. М. Кривенко, М. Ю. Юркевич, А. П. Власов, Я. М. Мотузова, Н. Ф. Миланович, Ю. М. Гаин, Ю. Е. Демидчик // Инновац. технологии в медицине. – 2013. – № 1. – С. 39–51.

19. Динамика цитокинов у пациентов с рассеянным склерозом до и после клеточной терапии / М. М. Зафранская, Д. Б. Нижегородова, Г. И. Иванчик, А. В. Борисов, Г. В. Кожух, Е. А. Назарова, А. С. Федулов // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2014. – № 3. – С. 82–91.

20. Нейропротекторный эффект трансплантации аутологичных мезенхимальных стволовых клеток у пациентов с рассеянным склерозом / А. С. Федулов, М. М. Зафранская, Д. Б. Нижегородова, Л. Н. Марченко, Т. В. Качан, Г. И. Иванчик, А. В. Борисов, С. И. Кривенко, М. Ю. Юркевич // Неврология и нейрохирургия. Вост. Европа. – 2015. – № 4. – С. 97–108.

21. Иммунологический мониторинг пациентов с рассеянным склерозом после аутологичной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток / М. М. Зафранская, Д. Б. Нижегородова, М. Ю. Юркевич, А. В. Борисов, С. И. Кривенко, Г. И. Иванчик, С. С. Кулинич, А. С. Федулов // Иммунология. – 2015. – Т. 36, № 5. – С. 284–289.

22. Влияние мононуклеаров костного мозга и мезенхимальных стволовых клеток на пролиферацию спленоцитов крыс *in vitro* / М. М. Зафранская, Д. Б. Нижегородова, Т. В. Кондратович, М. Ю. Юркевич, К. С. Комиссаров, Г. И. Иванчик, С. С. Кулинич, В. С. Пилотович // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2015. – № 4. – С. 30–37.

Материалы конференций

23. Использование CFSE – метода для оценки пролиферации клеток / М. М. Зафранская, Д. Б. Нижегородова, Н. В. Ламовская, В. В. Кирюшкин, Г. И. Иванчик, К. В. Лазнев // Клиническая лабораторная диагностика в XXI веке : сб. материалов VII съезда специалистов клин. лаб. диагностики Респ. Беларусь, Минск, 25–26 окт. 2007 г. / ред.: В. И. Жарко [и др.]. – Минск, 2007. – С. 123–125.

24. Сравнительная характеристика мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани и костного мозга человека / Г. Я. Хулуп, Н. В. Ламовская, Д. Б. Нижегородова, С. Ю. Мاستицкая, Г. И. Иванчик, К. В. Лазнев, М. М. Зафранская // Состояние и перспективы трансплантологии : материалы Междунар. науч.-практ. конф. (Минск, 9–10 окт. 2008 г.) / М-во здравоохран.

Респ. Беларусь, Комитет по здравоохранению Мингорисполкома, УЗ «9-я гор. клин. больница» г. Минска, Нац. академия наук Беларуси ; редкол.: В. С. Кушниренко [и др.]. – Минск, 2008. – С. 156–161.

25. Юшкевич, А. Ю. Оптимизация условий создания экспериментальной модели аллергического аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) / А. Ю. Юшкевич, Д. Б. Нижегородова, М. М. Зафранская // Сахаровские чтения 2008 года: экологические проблемы XXI века : материалы 8-й Междунар. науч. конф., 22–23 мая 2008 г., г. Минск, Респ. Беларусь / М-во природных ресурсов и охраны окружающей среды Респ. Беларусь [и др.] ; [под ред. С. П. Кундаса и др.]. – Минск, 2008. – С. 183.

26. Перспективы использования мезенхимальных стволовых клеток в лечении демиелинизирующих заболеваний ЦНС / Я. М. Мотузова, А. С. Федулов, М. М. Зафранская, Д. Б. Нижегородова, И. В. Пыко // Состояние и перспективы трансплантологии : материалы Междунар. науч.-практ. конф., (Минск, 9–10 окт. 2008 г.) / М-во здравоохр. Респ. Беларусь, Комитет по здравоохранению Мингорисполкома, УЗ «9-я гор. клин. больница» г. Минска, Нац. академия наук Беларуси ; редкол.: В. С. Кушниренко [и др.]. – Минск, 2008. – С. 188–194.

27. Экспрессия невральных маркеров мезенхимальными стволовыми клетками / С. С. Багатка, М. Ю. Колобова, Д. Б. Нижегородова, С. Ю. Мاستицкая, М. М. Зафранская // Нейроиммунология. – 2009. – Т. 7, № 1. – С. 11. – Материалы XVII Всерос. конф. «Нейроиммунология, рассеянный склероз» и Всерос. конф. неврологов, 23–26 мая 2009 г., Санкт-Петербург, Россия.

28. Влияние мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани крыс с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом и супернатантов клеточных культур на миелин-специфическую пролиферацию спленоцитов здоровых крыс / Д. Б. Нижегородова, М. Ю. Колобова, С. С. Багатка, Г. И. Иванчик, М. М. Зафранская // Нейроиммунология. – 2009. – Т. 7, № 1. – С. 11. – Материалы XVII Всерос. конф. «Нейроиммунология, рассеянный склероз» и Всерос. конф. неврологов, 23–26 мая 2009 г., Санкт-Петербург, Россия.

29. Эффективность и безопасность трансплантации мезенхимальных и гемопоэтических стволовых клеток на модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита / А. С. Федулов, М. М. Зафранская, Я. М. Мотузова, Д. Б. Нижегородова, С. А. Гузов, С. С. Багатка, М. Ю. Юркевич, М. А. Шпаковская // Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии : сб. науч. тр. к 80-летию гематол. и трансфузиол. служб Респ. Беларусь, 24–25 мая 2012 г. / Респ. науч.-практ. центр трансфузиологии и мед. биотехнологий ; под ред. Г. Я. Хулупа. – Минск, 2012. – С. 232–234.

30. Мониторинг иммунологических показателей у пациентов с рассеянным склерозом после аутологичной трансплантации мезенхимальных/стромальных стволовых клеток / М. М. Зафранская, Г. И. Иванчик, Е. Б. Рудаковская, Я. М. Мотузова, А. В. Борисов, А. С. Федулов // Рос. иммунол. журн. – 2013. – Т. 7, № 2/3. – С. 304. – Материалы объедин. иммунол. форума. Нижний Новгород, 30 июня – 5 июля 2013, Россия.

31. Оценка иммуносупрессивных свойств мезенхимальных стволовых клеток и характеристика иммуномодулирующего эффекта клеточной терапии при рассеянном склерозе / М. М. Зафранская, А. С. Федулов, Д. Б. Нижегородова, Я. М. Мотузова, С. И. Кривенко, М. Ю. Юркевич, Н. Ф. Миланович, Г. И. Иванчик, А. В. Борисов, И. В. Свирид, С. С. Багатка, Е. Б. Рудаковская, Е. А. Назарова, Ю. М. Гаин, Ю. Е. Демидчик // Актуальные вопросы трансплантации стволовых клеток : сб. материалов I Евраз. конгр. «Трансплантация стволовых клеток» (Минск, 25–27 сент. 2013 г.) ; рец. совет: О. В. Алейникова [и др.]. – Минск, 2013. – С. 44–46.

32. The assessment of immunomodulatory effects of cell therapy in multiple sclerosis patients after autologous mesenchymal/stromal stem cells transplantation / M. M. Zafranskaya, A. S. Fedulov, M. Yu. Yurkevich, S. S. Kulinich, H. I. Ivanchik, A. V. Borisov, T. V. Kachan, D. B. Nizheharodava // J. Neuroimmunol. – 2014. – Vol. 275, № 1/2. – P. 74. – 12th Intern. Congr. of Neuroimmunology, Mainz, Germany, Nov. 2014.

33. Cytokines production in multiple sclerosis patients after intravenous infusion of autologous mesenchymal stem cells / D. Nizheharodava, M. Yurkevich, H. Ivanchik, S. Kulinich, M. Zafranskaya // J. Neuroimmunol. – 2014. – Vol. 275, № 1/2. – P. 192–193. – 12th Intern. Congr. of Neuroimmunology, Mainz, Germany, Nov. 2014.

34. Цывинская, А. В. *In vitro* влияние мезенхимальных стволовых клеток на количество CD8⁺ Т-лимфоцитов у пациентов с рассеянным склерозом / А. В. Цывинская, М. М. Зафранская // Сахаровские чтения 2014 года: экологические проблемы XXI века : материалы 14-й Междунар. науч. конф., 29–30 мая 2014 г., г. Минск, Респ. Беларусь / под ред. В. И. Дуная, С. С. Позняка, Н. А. Лысухо. – Минск, 2014. – С. 134.

35. Фещенко, Е. В. Роль иммуноглобулина М и тромбоцитарного фактора роста в оценке ремиелинизирующего эффекта мезенхимальных стволовых клеток у пациентов с рассеянным склерозом / Е. В. Фещенко, Т. В. Качан, М. М. Зафранская // Сахаровские чтения 2015 года: экологические проблемы XXI века : материалы 15-й Междунар. науч. конф., 21–22 мая 2015 г., г. Минск, Респ. Беларусь / под ред. С. С. Позняка, Н. А. Лысухо. – Минск, 2015. – С. 100–101.

36. Сравнительная характеристика фенотипических маркеров лимфоцитов периферической крови пациентов с рассеянным склерозом после одно- и двукратной трансплантации аутологичных мезенхимальных стволовых клеток / Д. Б. Нижегородова, М. Ю. Юркевич, С. С. Кулинич, Г. И. Иванчик, А. В. Борисов, Е. А. Назарова, М. М. Зафранская // *Нейроиммунология*. – 2015. – Т. 12, № 1/2. – С. 24. – Материалы науч.-практ. конф. неврологов. XX Всерос. конф. «Нейроиммунология, рассеянный склероз», 28–31 мая 2015 г., Санкт-Петербург, Россия.

37. Биологические маркеры в оценке ремиелинизирующего эффекта аутологичных мезенхимальных стволовых клеток у пациентов с рассеянным склерозом / М. М. Зафранская, Д. Б. Нижегородова, Т. В. Качан, М. Ю. Юркевич, Г. И. Иванчик, С. С. Кулинич, Е. А. Назарова, А. С. Федулов // *Нейроиммунология*. – 2015. – Т. 12, № 1/2. – С. 12. – Материалы науч.-практ. конф. неврологов. XX Всерос. конф. «Нейроиммунология, рассеянный склероз», 28–31 мая 2015 г., Санкт-Петербург, Россия.

Тезисы докладов

38. Interferon- β therapy reduces autoreactive CD8⁺ memory T cell response in multiple sclerosis / M. Zafranskaya, R. Engel, A. Weishaupt, P. Oschmann, H. Jomaa, M. Eberl // *Immunobiology*. – 2005. – Vol. 210, № 6/8. – P. 415–416. – Abstr. of the Joint Annu. Meet. of the German and Scand. Societies for Immunology, Kiel, Germany, 2005.

39. Antigen-specific response of splenocytes in co-cultivation with AMSC from EAE rats / M. Zafranskaya, G. Khulup, D. Nizheharodava, A. Fedulov, N. Lamovskaya, H. Ivanchik // *Serbian J. Exp. Clin. Res.* – 2008. – Vol. 9, suppl. № 1. – P. 108. – Abstr. of the Second EFIS/EJI Belgrade Symposium “Inflammation at the Interface of Innate and Acquired Immunity”, 7–10, Sept. 2008, Belgrad, Serbia.

40. Nizheharodava, D. Technical approaches of antigen-specific response estimation in experimental model of autoimmune encephalomyelitis / D. Nizheharodava, H. Ivanchyk, M. Zafranskaya // *Serbian J. Exp. Clin. Res.* – 2008. – Vol. 9, suppl. № 1. – P. 98. – Abstr. of the Second EFIS/EJI Belgrade Symposium “Inflammation at the Interface of Innate and Acquired Immunity”, 7–10 Sept. 2008, Belgrad, Serbia.

41. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells suppress myelin-stimulated CD4⁺ and CD8⁺ effector-memory T cells proliferation in multiple sclerosis patients / M. Zafranskaya, G. Khulup, D. Nizheharodava, N. Milanovich, M. Kolobova, S. Bagatka, A. Fedulov // *Eur. J. Immunol.* – 2009. – Vol. 39, № S1. – P. 492. – Abstr. from the 2nd Europ. Congr. of Immunology, 13–16 Sept. 2009, Berlin, Germany.

42. Mesenchymal stem cell transplantation reduces demyelination and inflammation and induces clinical recovery in experimental autoimmune encephalomyelitis / Y. Motuzova, A. Fedulau, D. Nizheharodova, S. Guzov, S. Bagatka, M. Kolobova, M. Zafranskaya // Eur. J. Neurol. – 2010. – Vol. 17, suppl. 3. – P. 233. – Abstr. of the 14th Congr. of Europ. Federation of Neurological Societies, Geneva, Switzerland, Sept. 2010.

43. PGE2 mediates *in vitro* bMSC-dependent inhibition of T cells proliferation / M. Zafranskaya, A. Fedulov, D. Nizheharodava, M. Kolobova, G. Ivanchik, Y. Motuzova // Scand. J. Immunol. – 2010. – Vol. 71, № 6. – P. 493. – Abstr. of 39th meet. of Scand. Society for Immunology jointly with the Baltic Immunological Society, Tallinn, Estonia, 2010.

44. PGE2 mediates *in vitro* bMSC-dependent inhibition of myelin-stimulated T-cells proliferation in MS patients / M. Zafranskaya, A. Fedulov, D. Nizheharodava, M. Yurkevich, G. Ivanchik, S. Bagatka, Y. Motuzova, N. Milanovich // J. Neuroimmunol. – 2010. – Vol. 228, № 1/2. – P. 152–153. – Abstr. of the 10th Intern. Congr. of Neuroimmunology, Sitges, Spain, 2010.

45. Stem cell transplantation in experimental autoimmune encephalomyelitis / Y. Motuzova, A. Fedulau, D. Nizheharodava, S. Guzov, S. Bagatka, M. Kolobova, M. Zafranskaya // J. Neurol. – 2011. – Vol. 258, № 1. – P. 68. – 21st Meet. of the Europ. Neurological Society, Lisbon, Portugal, May 2011.

46. In vitro CD119 expression on stimulated T-lymphocytes as a marker of bone-marrow-derived MSCs immunosuppressive ability in multiple sclerosis patients / M. Zafranskaya, D. Nizheharodava, M. Yurkevich, H. Petrova, S. Bagatka // Abstr. of the EFIS-EJI Symposium, Visegrad, Hungary Sept. 2011. – Visegrad, Hungary, 2011. – P. 33.

47. Zafranskaya, M. The dynamics of memory T lymphocytes and $\gamma\delta$ T-cells in multiple sclerosis patients after intravenous infusion of autologous mesenchymal stem cells / M. Zafranskaya, Y. Motuzova, M. Yurkevich, A. Borisov, D. Nizheharodava, S. Krivenko, N. Dedyulya, S. Bagatka, E. Rudakovskaya, A. Fedulov // Immunology. – 2012. – Vol. 137, suppl. 1. – P. 121. – Abstr. of the 3d Europ. Congr. of Immunology, Glasgow, UK, 5–8 Sept. 2012.

48. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in multiple sclerosis / Y. Motuzova, O. Ionova, M. Zafranskaya, A. Borisov, D. Nizheharodava, I. Svirid, D. Balvanovich, T. Kachan, A. Fedulau // J. Neurol. Sci. – 2013. – Vol. 333, suppl. 1. – P. e383. – Abstr. of the XXI World Congr. of Neurology, 21–23 Sept. 2013, Vienna, Austria.

49. Transforming growth factor beta and interleukin-10 in multiple sclerosis patients after intravenous infusion of autologous mesenchymal stem cells [Electronic resource] / M. Zafranskaya, H. Ivanchik, D. Nizheharodava, M. Yurkevich, Y. Motuzova, E. Selezneva, A. Borisov, A. Fedulov // 15th International Congress of

Immunology (ICI), Milan, Italy, 22–27 Aug. 2013. – Mode of access: [http://www.frontiersin.org/10.3389/conf.fimmu.2013.02.00556/event_abstract?sname=15th_International_Congress_of_Immunology_\(ICI\)](http://www.frontiersin.org/10.3389/conf.fimmu.2013.02.00556/event_abstract?sname=15th_International_Congress_of_Immunology_(ICI)). – Date of access: 07.11.2013.

50. The characteristic of minor cell populations in multiple sclerosis patients after cell therapy [Electronic resource] / D. Nizheharodava, A. Borisov, E. Nazarova, E. Rudakovskaya, M. Zafranskaya // 15th International Congress of Immunology (ICI), Milan, Italy, 22–27 Aug. 2013. – Mode of access: [http://www.frontiersin.org/10.3389/conf.fimmu.2013.02.00590/event_abstract?sname=15th_International_Congress_of_Immunology_\(ICI\)](http://www.frontiersin.org/10.3389/conf.fimmu.2013.02.00590/event_abstract?sname=15th_International_Congress_of_Immunology_(ICI)). – Date of access: 07.11.2013.

51. Zafranskaya, M. Using multipotent mesenchymal stromal cells in regenerative medicine [Electronic resource] / M. Zafranskaya, Y. Gain, Y. Demidchik // Regen. Med. – 2013. – Vol. 8, № 6S. – P. S342. – Mode of access: <http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/rme.13.pp>. – Date of access: 02.12.2013. – Abstr. of World Conf. on Regenerative Medicine, Oct. 23–25, Leipzig, Germany.

52. Immunological changes in multiple sclerosis patients after autologous mesenchymal stem cells intravenous infusion [Electronic resource] / D. Nizheharodava, E. Rudakovskaya, S. Krivenko, H. Ivanchik, I. Svirid, A. Fedulov, M. Zafranskaya // Regen. Med. – 2013. – Vol. 8, № 6S. – P. S423. – Mode of access: <http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/rme.13.pp>. – Date of access: 02.12.2013. – Abstr. of World Conf. on Regenerative Medicine, Oct. 23–25, Leipzig, Germany.

53. Effect of cell therapy in multiple sclerosis patients after intravenous administration of mesenchymal/stromal stem cells [Electronic resource] / M. Zafranskaya, D. Nizheharodava, A. Borisov, M. Yurkevich, H. Ivanchik, S. Krivenko, T. Kachan, E. Nazarova, N. Milanovich, Y. Demidchik, A. Fedulov // Cell technologies at the edge: research & practice (CTERP): abstract, 6–8, April 2016, Saint-Petersburg, Russia. – P. 132–133. – Mode of access: <http://cterp.org/cterp-2016-abstracts-are-published/>. – Date of access: 17.04.2016.

Патенты

54. Способ прогнозирования развития рецидива рассеянного склероза : пат. 13874 Респ. Беларусь : МПК А 61В 5/00, G 01N 33/48 / Д. Б. Нижегородова, М. М. Зафранская, А. С. Федулов ; дата публ.: 30.12.2010.

55. Способ определения возможности использования аутологичных мезенхимальных стволовых клеток для патогенетического лечения рассеянного склероза : пат. 14154 Респ. Беларусь : МПК С 12N 5/06 (2009) / Г. Я. Хулуп, М. М. Зафранская, А. С. Федулов, Д. Б. Нижегородова ; дата публ.: 30.04.2011.

56. Способ определения возможности использования мезенхимальных стволовых клеток для аллогенной трансплантации больному с патологией

крововетворения : пат. 17751 Респ. Беларусь : МПК G 01N 33/577 / М. М. Зафранская, А. Л. Усс, С. И. Кривенко, Д. Б. Нижегородова ; дата публ.: 30.12.2013.

57. Способ определения возможности использования мезенхимальных стволовых клеток в патогенетической иммуносупрессивной терапии : пат. 18065 Респ. Беларусь : МПК С 12N 5/0775 (2010.01), А 61К 35/12 (2006.01) / М. М. Зафранская, Д. Б. Нижегородова ; дата публ.: 30.04.2014.

Заявка на патент

58. Способ лечения пациента с рассеянным склерозом : заявка 20130825 Респ. Беларусь : МПК G 01N 33/48 (2006.01), С 12N 5/077 (2010.01) / М. М. Зафранская, А. С. Федулов, Ю. Е. Демидчик, Д. Б. Нижегородова, С. И. Кривенко, Я. М. Мотузова ; дата публ.: 28.02.2015.

Инструкции по применению

59. Метод оценки иммуносупрессивных свойств мезенхимальных стволовых клеток костного мозга пациентов с рассеянным склерозом : инструкция по применению : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 03.12.2010 / сост. М. М. Зафранская, А. С. Федулов, Д. Б. Нижегородова, Я. М. Мотузова, М. Ю. Юркевич, С. С. Багатка, Г. И. Иванчик, А. П. Власов, Г. В. Кожух, Н. Ф. Миланович. – Минск, 2010. – 18 с.

60. Метод клеточной терапии рассеянного склероза : инструкция по применению : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 27.12.2013 / сост. А. С. Федулов, М. М. Зафранская, Я. М. Мотузова, Д. Б. Нижегородова, С. И. Кривенко, А. В. Борисов, М. Ю. Юркевич, С. С. Багатка, Г. И. Иванчик, Н. Ф. Миланович, Т. В. Качан, И. В. Свирид, Д. И. Балванович. – Минск, 2013. – 11 с.

Другие научные издания

61. Зафранская, М. М. Мезенхимальные стволовые клетки при рассеянном склерозе : монография / М. М. Зафранская, А. С. Федулов, Д. Б. Нижегородова. – Lambert Academic publishing, 2012. – 141 с.

Зафранская Марына Міхайлаўна

Мезенхімальныя ствалавыя клеткі: імунамадулюючыя ўласцівасці і абгрунтаванне іх прымянення для клеткавай імунатэрапіі рассеянага склерозу

Ключавыя словы: мезенхімальныя ствалавыя клеткі, рассеяны склероз, імунасупрэсія, міелін-спецыфічныя Т-клеткі памяці, клеткавая імунатэрапія.

Мэта даследавання: абгрунтаванне імунапатагенетычнага дзеяння і клінічнага ўжывання клеткавай тэрапіі аўталагічнымі мезенхімальнымі ствалавымі клеткамі пры рассеяным склерозе.

Метады даследавання і выкарыстаная апаратура: эксперыментальныя, культуральныя, імуналагічныя, мікраскапічныя, статыстычныя; CO₂-інкубатар (Revco Elite II, ЗША), ламінарны бокс II класа абароны (Labconco Purifier Delta, ЗША), інвертаваны мікраскоп Axiovert 200 і камера AxioCamMRm (Carl Zeiss, Германія), праточны цытафлуарыметр FC500 (Beckman Coulter, ЗША), спектрафатометр BRIO-SIRIO (SEAC, Італія).

Атрыманыя вынікі і навуковая навізна: абгрунтавана і распрацавана тэхналогія клеткавай імунатэрапіі рассеянага склерозу з выкарыстаннем аўталагічных мезенхімальных ствалавых клетак з улікам папярэдняга разліку каэфіцыента супрэсіі клеткавымі культурамі міелін-стымуляванай праліферацыі Т-лімфацытаў. Упершыню паказана, што аўталагічныя мезенхімальныя ствалавыя клеткі пацыентаў з рассеяным склерозам і алагенныя мезенхімальныя ствалавыя клеткі ад здравых асоб у роўнай ступені інгібіруюць *in vitro* праліферацыю Т-клетак памяці. Упершыню праведзена ацэнка эфектыўнасці і працягласці імунамадулюючага эфекту аўталагічных мезенхімальных ствалавых клетак і абгрунтаваны метадалагічны падыход да ацэнкі тэрапеўтычнага эфекту клеткавай імунатэрапіі рассеянага склерозу.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: распрацаваныя крытэрыі вызначэння патэнцыяльнага тэрапеўтычнага эфекту клеткавай імунатэрапіі могуць прымяняцца для эфектыўнага лячэння пацыентаў з рассеяным склерозам з выкарыстаннем аўталагічнай трансплантацыі мезенхімальных ствалавых клетак.

Галіна прымянення: імуналогія, неўралогія, нейраімуналогія, транспланталогія, клетачная біялогія, лабараторная дыягностыка.

РЕЗЮМЕ**Зафранская Марина Михайловна****Мезенхимальные стволовые клетки: иммуномодулирующие свойства и обоснование их применения для клеточной иммунотерапии рассеянного склероза**

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, рассеянный склероз, иммуносупрессия, миелин-специфические Т-клетки памяти, клеточная иммунотерапия.

Цель исследования: обоснование иммунопатогенетического действия и клинического внедрения клеточной терапии аутологичными мезенхимальными стволовыми клетками при рассеянном склерозе.

Методы исследования и использованная аппаратура: экспериментальные, культуральные, иммунологические, микроскопические, статистические; CO₂-инкубатор (Revco Elite II, США), ламинарный бокс II класса защиты (Labconco Purifier Delta, США), инвертированный микроскоп Axiovert 200 и камера AxioCamMRm (Carl Zeiss, Германия), проточный цитофлуориметр FC500 (Beckman Coulter, США), спектрофотометр BRIO-SIRIO (SEAC, Италия).

Полученные результаты и научная новизна: обоснована и разработана технология клеточной иммунотерапии рассеянного склероза с использованием аутологичных мезенхимальных стволовых клеток с учетом предварительного расчета коэффициента супрессии клеточными культурами миелин-стимулированной пролиферации Т-лимфоцитов. Впервые показано, что аутологичные мезенхимальные стволовые клетки пациентов с рассеянным склерозом и аллогенные мезенхимальные стволовые клетки от здоровых лиц в равной степени ингибируют *in vitro* пролиферацию Т-клеток памяти. Впервые проведена оценка эффективности и длительности иммуномодулирующего эффекта аутологичных мезенхимальных стволовых клеток и обоснован методологический подход к оценке терапевтического эффекта клеточной иммунотерапии рассеянного склероза.

Рекомендации по использованию: разработанные критерии определения потенциального терапевтического эффекта клеточной иммунотерапии могут применяться для эффективного лечения пациентов с рассеянным склерозом с использованием аутологичной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток.

Область применения: иммунология, неврология, нейроиммунология, трансплантология, клеточная биология, лабораторная диагностика.

SUMMARY

Zafranskaya Maryna Mikhailovna

Mesenchymal stem cells: immunomodulatory properties and grounding their application for the cell immunotherapy in multiple sclerosis

Key-words: mesenchymal stem cells, multiple sclerosis, immunosuppression, myelin-specific memory T cells, cell immunotherapy.

Aim of the research: to ground the immunopathogenic effect and the clinical application of autologous mesenchymal stem cell therapy in multiple sclerosis.

Methods of the research and the equipment used: experimental, cultural, immunological, microscopical, statistical; CO₂-incubator («Revco Elite II», USA), class II biological safety cabinet («Labconco Purifier Delta», USA), Axiovert 200 inverted microscope and camera AxioCamMRm («Carl Zeiss», Germany), flow cytometer FC500 («Beckman Coulter», USA), spectrophotometer BRIO-SIRIO («SEAC», Italy).

Obtained results and scientific novelty: the technology for the cell immunotherapy of multiple sclerosis using autologous mesenchymal stem cells taking into consideration previously counted suppression coefficient showing the suppression of myelin-stimulated T lymphocytes proliferation by cell cultures has been grounded and developed. For the first time it has been shown that the both autologous mesenchymal stem cells from patients with multiple sclerosis and allogenic mesenchymal stem cells from healthy subjects similarly inhibit the *in vitro* proliferation of memory T cells. The efficacy and duration of the immunomodulatory effect of autologous mesenchymal stem cells has been assessed for the first time, and the methodological approach for evaluating the therapeutic effect of cell immunotherapy in multiple sclerosis has been grounded.

Recommendations for the use: the developed criteria for determining the potential therapeutic effect of cell immunotherapy can be applied for the effective treatment of patients with multiple sclerosis using autologous transplantation of mesenchymal stem cells.

Field of the application: immunology, neurology, neuroimmunology, transplantology, cell biology, laboratory diagnosis.

Подписано в печать 20.09.16. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Снегурочка».
Ризография. Гарнитура «Times».
Усл. печ. л. 2,56. Уч.-изд. л. 2,83. Тираж 60 экз. Заказ 639.

Издатель и полиграфическое исполнение: учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/187 от 18.02.2014.
Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.