

## Использование гемопоэтических клеток-предшественников для коррекции иммунофизиологических нарушений при угрожающих и критических состояниях

UDC 616-009.17:591.147.3+576.3

Е.М. KLIMOVA\*, L.A. DROZDOVA, L.A. SHAKINA, T.S. ANTONENKO, O.S. MEREZHKO

## Usage of Hemopoietic Precursor Cells for Correcting Immune-Physiological Disorders Under Dangerous and Critical States

В работе использовали стволовые гемопоэтические клетки (СГК) фетальной печени и гемопоэтические клетки-предшественники кордовой крови (ГКП КК) для коррекции иммунологических нарушений у больных циррозом печени, панкреанекрозом, диабетом II типа, с синдромом Ляриша, политравмой. У обследованных больных при поступлении в клинику выявлены нарушения в клеточном и гуморальном звеньях иммунного ответа. Трансфузия СГК и ГКП КК приводила у большинства пациентов к позитивным изменениям концентрации циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), значений константы ЦИК, лимфоцитотоксичности, уровня дифференцировочных маркеров CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>.

**Ключевые слова:** клеточная терапия, иммунокоррекция, угрожающие и критические состояния.

У роботі використовували ствові гемопоетичні клітини (СГК) фетальної печінки та гемопоетичні клітини-попередники кордової крові (ГКП КК) для корекції імунологічних порушень у хворих циррозом печінки, панкреанекрозом, діабетом II типу, з синдромом Ляриша, політравмой. В обстежених хворих на момент прибуття до клініки виявлені порушення у клітинній та гуморальній ланках імунної відповіді. Трансфузія СГК і ГКП КК приводила у більшості пацієнтів до позитивних змін концентрації циркулюючих імунних комплексів (ЦИК), значень константи ЦИК, лімфоцитотоксичності, рівня маркерів диференціювання CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>.

**Ключові слова:** клітинна терапія, імунокорекція, загроzoneбезпечні та критичні стани.

This research shows the usage of hemopoietic stem cells (HSCs) of fetal liver and cord blood hemopoietic precursor cells (CB HPCs) for correcting immunological disorders in patients with hepatocirrhosis, pancreas necrosis, diabetes of II type, Larish syndrome, polytrauma. The disorders in cell and humoral links of immune response have been revealed in the examined patients at their entering in the hospital. The HSCs and CB HPCs transfusions in the most of patients resulted in the positive changes of circulating immune complexes (CICs) concentration, CICs constant values, lymphotoxicity, level of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> differentiated markers.

**Key-words:** cell therapy, immune correction, dangerous and critical states.

Интенсивное развитие клеточной биологии в последние годы послужило основой для внедрения в медицинскую практику новых биомедицинских методов лечения, среди которых значительное место занимают клеточные технологии. Применение клеток для лечения патологий развивалось по двум основным направлениям: пересадка клеток фетального происхождения и постнатальных стволовых клеток, в том числе органоспецифических клеток-предшественников. Фетальные стволовые гемопоэтические клетки обладают рядом преимуществ, которые позволяют использовать их в эксперименте и эффективно применять в медицинских целях [4]. Пластичность СГК определяет их способность генерировать под действием факторов микроокружения клеточные клоны с различными кластерами дифференцировки. Наряду с этим фетальные стволовые клетки экспрессируют незна-

чительное количество антигенов HLA I и II классов на клеточной мембране. Важно, что СГК способны к длительной пролиферации без дифференцировки в культуре клеток и направленной трансдифференцировке под действием факторов роста и других сигнальных молекул. Фетальные стволовые клетки обладают аутокринными свойствами и продуцируют уникальный комплекс цитокинов и ростовых факторов, а также способны к активной миграции и репопуляции.

Накоплен достаточный опыт использования клеточного материала для коррекции метаболических нарушений в эксперименте при моделировании различных патологий [1, 2]. В медицинской практике эффективно используются клеточные технологии для коррекции нарушений гемопоэза, первичных и вторичных иммунодефицитов [3, 5]. Существует проблема коррекции метаболических нарушений

ГУ "Институт общей и неотложной хирургии АМН Украины", г. Харьков

Institute of General and Urgent Surgery of the Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: въезд Балакирева, 1, г. Харьков, Украина 61018; тел.:+38 (057) 715-33-48, факс: +38 (057)715-33-45, электронная почта: ssvnauka@tns.kharkov.ua

\* To whom correspondence should be addressed: 1, Balakireva str., Kharkov, Ukraine 61018; tel.:+380 57 7153348, fax: +380 57 7153345, e-mail: ssvnauka@tns.kharkov.ua

у больных с угрожающими и критическими состояниями, при которых правильно и своевременно выполненное оперативное вмешательство, контролируемая полисиндромная терапия нарушений гомеостаза, целесообразная антибактериальная терапия и направленная детоксикация не могут обеспечить восстановление метаболизма. В связи с этим перспективным является использование клеточной терапии.

Цель исследования – обоснование применения стволовых гемопоэтических клеток фетальной печени и гемопоэтических клеток-предшественников кордовой крови для коррекции иммунологических нарушений у больных циррозом печени, панкреанекрозом, диабетом II типа, с синдромом Ляриша, политравмой.

### Материалы и методы

Материалом для исследования служили форменные элементы и сыворотка крови больных с угрожающими и критическими состояниями. В исследованиях применяли криоконсервированные трансплантаты различного происхождения (фетальная печень и кордовая кровь) при условии тестирования сателитной пробы на жизнеспособность в тесте КОЭ-ГМ ( $60-80 \times 10^6$  – для СГК и  $1-15 \times 10^6$  – для ГКП КК) в виде внутривенной трансфузии после размораживания при  $37^\circ\text{C}$  на водяной бане.

Концентрацию циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) оценивали методом селективной преципитации комплексов антиген-антитело в полиэтиленгликоле с последующим фотометрическим определением плотности преципитата и молекулярной массы методом, основанным на способности комплексов к различной степени преципитации в полиэтиленгликоле. Содержание аутоиммунных антител определяли по классическому методу Теракаки (тест на лимфоцитотоксичность). Для проведения теста использовали лейкоцитарную взвесь с гомологичной сывороткой крови, в которую для образования комплекса антиген-комplement-антитело вносили complement. В взвесь добавляли эозин и метиленовый синий для подсчета количества живых и мертвых клеток по дифференциальному окрашиванию. Экспрессию дифференцировочных рецепторов лимфоцитов CD3, CD4, CD8, CD19 оценивали непрямым иммунофлюоресцентным методом с использованием моноклональных антител (МКАТ).

Полученные данные обрабатывали методом статистического анализа с использованием критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

При исследовании показателей гуморального звена иммунитета у больных с критическими и

угрожающими состояниями (циррозом печени, панкреанекрозом, диабетом II типа, синдром Ляриша, политравмой) на момент поступления в клинику было выявлено значительное повышение концентрации ЦИК в среднем на  $164,1-602,4\%$ ,  $P > 0,999$  (контроль  $98,3 \pm 21,1$  ед. Е), в то время как константа, характеризующая молекулярную массу ЦИК, была снижена на  $0,34-0,41$  по сравнению с контролем  $1,3 \pm 0,4$ , что свидетельствует о патогенности ЦИК. Трансфузия фетальных СГК у больных с критическими и угрожающими состояниями приводила к позитивному снижению концентрации ЦИК на  $114,7-530,1$  ед. Е ( $P > 0,99$ ) и нормализации значений константы у большинства пациентов в среднем до  $1,1 \pm 0,2$ . В группе больных циррозом печени, которым была выполнена трансфузия ГКП КК, выявлены снижение концентрации ЦИК на  $230,7$  ед. Е ( $P > 0,99$ ) и повышение константы ЦИК до  $1,0 \pm 0,1$ .

Показатель лимфоцитотоксичности (ЛЦТ), характеризующий степень аутоиммунной реакции, в исследуемой группе больных с угрожающими и критическими состояниями при первом обследовании превышал контрольные величины на  $36,8-48,3\%$ ,  $P > 0,99$  (контроль  $22,3 \pm 8,9\%$ ). Переливание СГК приводило к нормализации уровня антител к собственным лимфоцитам у больных циррозом печени и панкреанекрозом (в среднем до  $32,1-36,4\%$ ,  $P > 0,99$ ), достоверному снижению ЛЦТ у больных диабетом II типа (на  $27\%$ ,  $P > 0,99$ ). При сосудистой патологии, а также у больных с множественными структурными и функциональными нарушениями выявлена тенденция к снижению исследуемого показателя на  $14,5-16,4\%$ . Лечение цирроза печени с применением ГКП КК приводило к снижению показателя ЛЦТ до  $40,38 \pm 4,44\%$  ( $P < 0,99$ ).

В результате исследований уровня дифференцировочных маркеров CD у больных с синдромом Ляриша при поступлении в клинику показано снижение показателей  $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  Т-лимфоцитов в среднем на  $11,6-35,0\%$  ( $P > 0,99$ ) по сравнению с контролем. После трансфузии СГК в данной группе больных наблюдали тенденцию к повышению исследуемых показателей на  $3,2-9,1\%$ . У больных панкреанекрозом исходный уровень экспрессии дифференцировочных рецепторов  $CD4^+$  был снижен по сравнению с референтными величинами на  $12,9\%$  ( $P > 0,99$ ). Применение клеточной терапии приводило к нормализации данного показателя ( $28,3 \pm 5,2\%$ ,  $P > 0,99$ ). У больных диабетом II типа при поступлении выявлены значительное снижение субпопуляций  $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  Т-лимфоцитов в среднем на  $13,4-38,1\%$  ( $P > 0,99$ ) и двухкратное (до  $24,5 \pm 3,3\%$ ,  $P > 0,999$ ) повышение экспрессии дифференцировочных рецепторов

В-лимфоцитов CD19<sup>+</sup> (контроль 12,6±4,4 %). Лечение при помощи трансфузии СГК в данной группе больных способствовало нормализации уровня CD4<sup>+</sup>–, CD8<sup>+</sup>– Т-лимфоцитов, CD19<sup>+</sup>– В-лимфоцитов и повышению уровня дифференцировочных маркеров CD3<sup>+</sup> на 21,1% (P>0,99). Дифференцировочные рецепторы CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> у больных с политравмой были изначально снижены на 36,5 и 30,6% (P>0,99) соответственно. При трансплантации СГК данные показатели повышались на 10,1 и 13,4% (P>0,99). Дифференцировочные рецепторы CD у больных циррозом печени до трансфузии клеточных трансплантатов изменялись в сторону значительного снижения CD4<sup>+</sup>– Т-хелперов (на 18,3%, P>0,99, контроль 38,5±7,1) и увеличения субпопуляции CD8<sup>+</sup>– Т-лимфоцитов-супрессоров (на 28,5%, P>0,99, контроль 23,1±5,1%). После применения СГК иммунорегуляторный индекс нормализовался за счет повышения субпопуляции CD4<sup>+</sup>– Т-хелперов до 30,5±7,3% (P>0,95) и снижения CD8<sup>+</sup>– Т-супрессоров до 31,8±5,8 % (P>0,99). В то же время при трансплантации ГКП КК уровень CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов либо не изменялся, либо незначительно повышался. Уровень CD8<sup>+</sup>-супрессоров после трансфузии ГСК из кордовой крови был в пределах нормы (29,7±1,4%, P>0,99).

Следует отметить, что верифицированные нами изменения иммунологических параметров коррелировали со значительным улучшением состояния пациентов и уменьшением числа клинических проявлений заболеваний. После применения СГК

и ГКП КК наблюдали восстановление репаративных и регенеративных процессов, позитивную коррекцию нейроэндокринных нарушений, ингибирование некротических процессов.

### Выводы

Представленные данные свидетельствуют об эффективной иммунокоррекции с помощью трансфузии СГК и ГКП КК при угрожающих и критических состояниях. Применение гемопоэтических клеток-предшественников нормализовало клеточное и гуморальное звенья иммунного ответа.

### Литература

1. Bjorklund L.M., Sanchez-Pernaute R., Chung S. et al. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model // PNAS.– 2002.– Vol. 99, N4.– P. 2344–2349.
2. Brazelton T.R., Rossi F.M., Keshet G.I., Blau H.M. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice // Science.– 2000.– Vol. 290, N5497.– P. 1775–1779.
3. Jackson K.A., Majka S.M., Wang H. et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells // J. Clin. Invest.– 2001.– Vol. 107, N11.– P. 1395–1402.
4. Kondo M., Wagers A.J., Manz M.G. et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application // Annu. Rev. Immunol.– 2003.– Vol. 21.– P. 759–806.
5. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S. et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium // Nature.– 2001.– Vol. 410, N6829.– P. 701–705.

Поступила 10.07.2008