

Медико-биологические проблемы жизнедеятельности

Научно-практический рецензируемый журнал

№ 2(30)

2023 г.

Учредитель

Государственное учреждение
«Республиканский научно-
практический центр
радиационной медицины
и экологии человека»

Журнал включен в Перечень научных изданий Республики Беларусь для опубликования диссертационных исследований по медицинской и биологической отраслям науки (31.12.2009, протокол 25/1)

Журнал зарегистрирован
Министерством информации
Республики Беларусь,
Свид. № 762 от 6.11.2009

Подписано в печать 25.09.23
Формат 60×90/8. Бумага мелованная.
Гарнитура «Times New Roman».
Печать цифровая. Тираж 120 экз.
Усл. печ. л. 15,5. Уч.-изд. л. 9,54.
Зак. 556.

Издатель ГУ «Республиканский
научно-практический центр
радиационной медицины и
экологии человека»
Свидетельство N 1/410 от 14.08.2014

Отпечатано в КУП
«Редакция газеты
«Гомельская праўда»
г. Гомель, ул. Полесская, 17а

ISSN 2074-2088

Главный редактор, председатель редакционной коллегии

А.В. Рожко (д.м.н., профессор)

Редакционная коллегия

В.С. Аверин (д.б.н., профессор, зам. гл. редактора), В.В. Аничкин (д.м.н., профессор), В.Н. Беляковский (д.м.н., профессор), К.Н. Буздакин (к.т.н., доцент), Н.Г. Власова (д.б.н., профессор, научный редактор), А.В. Величко (к.м.н., доцент), И.В. Веякин (к.б.н., доцент), А.В. Воропаева (к.б.н., доцент), Д.И. Гавриленко (к.м.н.), М.О. Досина (к.б.н., доцент), А.В. Жарикова (к.м.н.), С.В. Зыблева (к.м.н., доцент, отв. секретарь), С.А. Игумнов (д.м.н., профессор), А.В. Коротчаев (к.м.н., доцент), Д.В. Кравченко (к.м.н.), А.Н. Лызинов (д.м.н., профессор), А.В. Макарич (к.м.н., доцент), С.Б. Мельнов (д.б.н., профессор), В.М. Мишура (д.м.н., доцент), Я.Л. Навменова (к.м.н., доцент), Э.А. Надьров (к.м.н., доцент), И.А. Новикова (д.м.н., профессор), Э.Н. Платошкин (к.м.н., доцент), Э.А. Повелица (к.м.н.), А.С. Подгорная (к.м.н.), Ю.И. Рожко (к.м.н., доцент), И.П. Ромашевская (к.м.н.), М.Г. Русаленко (к.м.н., доцент), А.П. Саивончик (к.б.н.), А.Е. Силин (к.б.н., доцент), А.Н. Стожаров (д.б.н., профессор), И.О. Стома (д.м.н., профессор), Н.И. Шевченко (к.б.н., доцент), Ю.И. Ярец (к.м.н., доцент)

Редакционный совет

А.В. Аклеев (д.м.н., профессор, Челябинск), О.В. Алейникова (д.м.н., чл.-кор. НАН РБ, Минск), С.С. Алексанин (д.м.н., профессор, Санкт-Петербург), Д.А. Базыка (д.м.н., профессор, Киев), А.П. Бирюков (д.м.н., профессор, Москва), Е.Л. Богдан (Минск), Л.А. Бокерия (д.м.н., академик РАН и РАМН, Москва), А.Ю. Бушманов (д.м.н., профессор, Москва), И.И. Дедов (д.м.н., академик РАМН, Москва), В.И. Жарко (Минск), М.П. Захарченко (д.м.н., профессор, Санкт-Петербург), Л.А. Ильин (д.м.н., академик РАМН, Москва), К.В. Котенко (д.м.н., профессор, Москва), В.Ю. Кравцов (д.б.н., профессор, Санкт-Петербург), Е.Н. Кроткова (к.м.н., доцент, Минск), Н.Г. Кручинский (д.м.н., профессор, Пинск), Т.В. Мохорт (д.м.н., профессор, Минск), Д.Л. Пиневиц (МЗ РБ, Минск), В.Ю. Рыбников (д.м.н., профессор, Санкт-Петербург), Н.Д. Тронько (д.м.н., чл.-кор. НАН, акад. НАМН Украины, Киев), А.Л. Усс (д.м.н., профессор, Минск), В.А. Филонюк (д.м.н., профессор, Минск), Р.А. Часнойть (к.э.н., Минск), В.Д. Шило (Минск)

Технический редактор

С.Н. Никонович

Адрес редакции 246040 г. Гомель, ул. Ильича, д. 290,
ГУ «РНПЦ РМ и ЭЧ», редакция журнала
тел (0232) 38-95-00, факс (0232) 37-80-97
<http://www.mbp.rcrm.by> e-mail: mbp@rcrm.by

© Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр
радиационной медицины и экологии человека», 2023

№ 2(30)

2023

Medical and Biological Problems of Life Activity

Scientific and Practical Journal

Founder

Republican Research Centre
for Radiation Medicine
and Human Ecology

Journal registration
by the Ministry of information
of Republic of Belarus

Certificate № 762 of 6.11.2009

© Republican Research Centre
for Radiation Medicine
and Human Ecology

ISSN 2074-2088

Обзоры и проблемные статьи**Reviews and problem articles**

С.В. Зыблева, Ю.И. Рожко, А.В. Жарикова, Б.О. Кабешев, С.Л. Зыблев

S.V. Zybleva, Yu.I. Rozhko, A.V. Zharikova, B.O. Kabeshev, S.L. Zyblev

Роль N-ацетилцистеина в терапии заболеваний, характеризующихся окислительным стрессом (обзор литературы) 6

The role N-acetylcysteine (nac) in the therapy of diseases characterized by oxidative stress (literature review)

Медико-биологические проблемы**Medical-biological problems**

Н.Н. Веялкина, Л.А. Белая, О.С. Аксёненко, А.Е. Сусленкова, Е.А. Медведева

N.N. Veialkina, L.A. Belaia, O.S. Aksenenko, A.E. Suslenkova, E.A. Medvedeva

Влияние хронического рентгеновского облучения в малых дозах на грудной отдел в эксперименте 17

Effect of chronic X-ray irradiation in low doses on the thoracic region in an experiment

И.Е. Гурьянова, Е.А. Полякова, К. Суффритти, Л.Б. Коростелева, С.Н. Алешкевич, Ю.С. Жаранкова, М.В. Белевцев

I.E. Guryanova, E.A. Polyakova, C. Suffritti, L.B. Korosteleva, S.N. Aleshkevich, Y.S. Zharankova, M.V. Belevtsev

Клиническая эффективность применения метода по определению расщепленного высокомолекулярного кининогена в диагностике наследственного ангиоотека 23

Clinical efficiency of the cleaved high-molecular-weight kininogen detection in the diagnosis of hereditary angioedema

А.-М.В. Ерофеева, С.В. Пинчук, С.Н. Рябцева, А.Ю. Молчанова

A.-M. Yerofeyeva, S. Pinchuk, S. Rjabceva, A. Molchanova

Активация каннабиноидных рецепторов II типа как вариант потенцирования мезенхимальных стволовых клеток в модели периферической нейропатической боли 29

Activation of type II cannabinoid receptors as variant for mesenchymal stem cell potentiation in a model of peripheral neuropathic pain

Я.И. Исайкина, В.В. Солодовникова, Р.Л. Фролова, Ю.В. Савич, А.А. Жерносеченко, Е.М. Скрыгина

Y. Isaikina, V. Solodovnikova, R. Frolova, U. Savich, H. Zhernasechanka, A. Skrahina

Мезенхимальные стволовые клетки из костного мозга пациентов с лекарственно-устойчивым туберкулезом для применения в клеточной терапии 40

Mesenchymal stem cells from bone marrow of patients with drug-resistant tuberculosis for cellular therapy

М.В. Кадука, Т.А. Бекяшева, С.А. Иванов, В.В. Ступина

M.V. Kaduka, T.A. Bekjasheva, S.A. Ivanov, V.V. Stupina

Содержание изотопов урана в некоторых видах пищевых продуктов. Оптимизация метода определения 46

Uranium isotopes content in the certain types of foodstuffs. Optimization of the analytical method

Е.К. Нилова, К.Н. Буздалкин		E.K. Nilova, K.N. Buzdalkin	
Геометрический фактор для оценки плотности загрязнения почвы <i>in-situ</i>	54	Geometry factor for <i>in-situ</i> soil contamination density estimation	
А.М. Островский, И.Н. Коляда		A.M. Ostrovsky, I.N. Kolyada	
Анализ смертности населения Гомельской области от инфекционных и паразитарных болезней в 2009-2019 гг.	62	Mortality analysis of the Gomel region population from infectious and parasitic diseases in 2009-2019	
Н.В. Поклонская, Ю.А. Шилова, Т.В. Амвросьева		N.V. Paklonskaya, Yu.A. Shilova, T.V. Amvrosieva	
Метод мультиплексной полимеразной цепной реакции для диагностики вирусной кишечной инфекции неуточненной	69	Multiplex polymerase chain reaction method for the diagnosis of unspecified viral acute gastroenteritis	

Клиническая медицина

Clinical medicine

Л.И. Данилова, В.А. Рожко, И.В. Веялкин, И.Г. Савастеева, С.Н. Никонович, Т.М. Шаршакова		L.I. Danilova, V.A. Rozhko, I.V. Veyalkin, I.G. Savasteeva, S.N. Nikonovich, T.M. Sharshakova	
Клинико-лабораторные особенности аутоиммунного тиреоидита у субъектов когорты по результатам скрининга	74	Clinical and laboratory features of autoimmune thyroiditis in subjects of the cohort according to the results of screening	
А.Ю. Захарко, А.С. Подгорная, О.В. Мурашко, Т.В. Статкевич, А.Р. Ромбальская		A.Yu. Zaharko, A.S. Podgornaya, O.V. Murashko, T.V. Statkevich, A.R. Rombalskaya	
Течение беременности, родов, состояние фетоплацентарного комплекса у женщин с абдоминальным ожирением и гипертензивными расстройствами	88	Course of pregnancy, delivery, the state of the fetoplacental complex in women with abdominal obesity and hypertensive disorders	
В.В. Крюков		V.V. Kryukov	
Состояние когнитивной сферы участников ликвидации последствий аварии на ЧАЭС	95	The state of the cognitions of clean-up workers of the consequences of the Chernobyl accident	
Д.М. Лось, В.С. Волчек		D. Los', V. Volchek	
Оценка осведомленности женского населения Гомельской области о профилактике и ранней диагностике рака молочной железы	106	Assessment of awareness of the female population of Gomel region about prevention and early diagnosis of breast cancer	
Н.А. Песковая, А.В. Солнцева		N.A. Peskavaya, A.V. Solntsava	
Факторы снижения минеральной плотности костной ткани у детей с синдромом Шерешевского-Тернера	111	Factors of reduced bone mineral density in children with Turner syndrome	

Обмен опытом

Experience exchange

Н.А. Метляева, А.Ю. Бушманов, И.А. Галстян, В.Ю. Нугис, М.В. Кончаловский, О.В. Щербатых, Ф.С. Торубаров, Е.О. Нечаева, А.С. Кретов, В.В. Кореньков

N.A. Metlyeva, A.Yu. Bushmanov, I.A. Galstyan, V.Yu. Nugis, M.V. Konchalovsky, O.V. Shcherbatykh, F.S. Torubarov, E.O. Nechaeva, A.S. Kretov, V.V. Korenkov

Психофизиологическая оценка индивидуальных особенностей личности у двух пациентов с тяжелыми местными лучевыми поражениями кистей рук и острой лучевой болезнью I степени (30 лет наблюдения)

Psychophysiological Assessment of Individual Personality in Two Patients with Severe Local Radiation Injuries (LRI) of Hand and Acute Radiation Sickness (ARS) I Degree (30 Years of Follow-up)

УДК: 616.24-002.5:615.281:616.71-018.46
DOI: 10.58708/2074-2088.2023-2(30)-40-45

Я.И. Исайкина¹, В.В. Солодовникова²,
Р.Л. Фролова¹, Ю.В. Савич¹,
А.А. Жерносеченко¹, Е.М. Скрыгина²

МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА ПАЦИЕНТОВ С ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

¹ГУ «РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии» г. Минск, Беларусь;

²ГУ «РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии» г. Минск, Беларусь

В статье приведены результаты исследования мезенхимальных стволовых клеток (МСК) из костного мозга пациентов с лекарственно-устойчивым туберкулезом легких (ЛУ-ТБ). Установлено, что они обладают более низкой пролиферативной активностью и потенциалом к экспансии *in vitro* по сравнению с МСК доноров, что осложняет получение высокой дозы аутологичных МСК для клеточной терапии пациентов. Предложена оптимизация условий производства клеточного продукта аутологичных МСК при слабой пролиферации клеток в первичной культуре в среде с 10% ЭТС, которая предполагает дальнейшее культивирование в присутствии 5% лизата тромбоцитов. Такая схема экспансии клеток позволила нам получать терапевтически эффективные дозы аутологичных МСК для введения пациентам с ЛУ-ТБ и может быть применена для получения биомедицинского клеточного продукта при проведении клеточной терапии пациентам, получавшим химиотерапию.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, лекарственно-устойчивый туберкулез

Введение

Лекарственно-устойчивая форма туберкулеза (ЛУ-ТБ), вызываемая микобактериями туберкулеза, резистентными к стандартной терапии, и сегодня является серьезной проблемой. Высокая заболеваемость, смертность, неудовлетворительные результаты лечения этой формы туберкулеза делает актуальным поиск новых методов терапии, так как возможности применения химиотерапии при МЛУ-ТБ ограничены

В настоящее время расширяется спектр заболеваний, в схему комплексного лечения которых включается метод клеточной терапии мезенхимальными стволовыми клетками (МСК). МСК обладают репаративными, иммуномодулирующими, антифиброзными, противовоспалительными свойствами, что делает многообещающим применение этих клеток в регенеративной медицине

и для лечения иммуноопосредованных и воспалительных заболеваний. Репаративный эффект МСК связан с синтезом клетками широкого спектра ростовых факторов и цитокинов, которые после введения МСК пациенту активируют эндогенные тканеспецифичные клетки-предшественники и стимулируют, таким образом, регенерацию тканей. Антифиброзный эффект МСК обусловлен присутствием в их секретоме внеклеточных везикул, подавляющих секрецию коллагена внеклеточного матрикса фибробластами и его депонирование [1], а также ингибирующих эпителиально-мезенхимальный переход, что тормозит фиброзный патологический процесс. Важнейшим фактором является стадия заболевания и наиболее значимо антифиброзное действие МСК проявляется на ранней фазе изменений в легочной ткани. Так, есть данные, что введение МСК в фиброзную ста-

дию развития болезни усугубляло пневмофиброз, в основном, из-за секреции МСК профибротического цитокина TGF- β [2]. С другой стороны, применение аллогенных МСК в клинической практике для лечения пациентов с идиопатическим легочным фиброзом показало прекращение прогрессии заболевания после введения клеток [3]. Противовоспалительный эффект МСК реализуется благодаря их способности мигрировать к местам активного воспаления, секреции противовоспалительных цитокинов и паракринного воздействия на клетки, синтезирующие факторы воспаления. Так, попадая в область воспаления, МСК секретирует TGF β 1, а также обладающий двойными свойствами интерлейкин-6, который способствует активной выработке моноцитами и макрофагами противовоспалительного ИЛ-10 и ингибированию экспрессии провоспалительного ИЛ-1 β [4].

МСК модулируют иммунный ответ *in vitro* и *in vivo* путем взаимодействия с широким спектром иммунных клеток, включая Т-лимфоциты, В-лимфоциты, естественные киллерные клетки и дендритные клетки. Работы ряда авторов свидетельствуют, что МСК супрессируют как пролиферацию Т-лимфоцитов, блокируя G0-G1 фазы клеточного цикла, так и их функциональную активность, а именно опосредованный цитотоксическими лимфоцитами лизис. В то же время, МСК являются индукторами пролиферации Т-регуляторных лимфоцитов, подавляющих активацию иммунной системы [5, 6]. Способность МСК, выделенных из костного мозга и выращенных в культуре, модулировать *in vitro* иммунный ответ предполагает использование этих клеток для лечения различных заболеваний, связанных с тяжелым нарушением иммунитета.

Одним из способов доставки МСК к пораженной ткани является внутривенное введение клеток, так как МСК обладают уникальным феноменом мигрировать к месту повреждения ткани. Применение радиоактивной метки показало, что МСК после в/в введения в здоровый организм мигрируют в различные органы, но боль-

шинство клеток (>90%) находят в легких [7]. Это связано с тем, что МСК, двигаясь с кровотоком по малому кругу кровообращения, попадают в легкие реципиента, где задерживаются в узких легочных капиллярах и только через 48-96 часов их можно детектировать в печени, селезенке, поджелудочной железе, головном мозге, почках, сердце и костном мозге [8, 9].

Все эти качества делают перспективным включение внутривенной инфузии МСК в комплексное лечение пациентов с ЛУ-ТБ. Для проведения такой клеточной терапии необходимо получение терапевтически эффективного биомедицинского клеточного продукта (БМКП), содержащего МСК в дозе не менее 10^6 на килограмм веса пациента.

В настоящее время не существует унифицированного протокола получения БМКП МСК. В различных лабораториях для экспансии клеток *in vitro* применяют как различные среды, так и добавки к ним, содержащие неорганические компоненты и органические молекулы (цитокины, гормоны, ростовые факторы и др.), которые обеспечивают пролиферацию МСК. Препараты, полученные из концентрата тромбоцитов человека, в том числе, лизат тромбоцитов (ЛТ), используются для пролиферации МСК в различных концентрациях: 5-10-20% в присутствии гепарина [10]. Отмечено, что применение ЛТ обеспечивает поддержание хромосомной стабильности клеток в течение не менее 12 пассажей и сокращает время удвоения клеток [10, 11].

Во многих случаях для клеточной терапии пациентов с ЛУ-ТБ получение полноценного эффективного по количеству клеток БМКП аутологичных МСК бывает затруднительным, что связано с длительной химиотерапией пациентов.

Целью настоящего исследования являлось проведение анализа пролиферативной активности МСК, полученных из костного мозга пациентов с ЛУ-ТБ, на разных этапах культивирования клеток и оптимизация протокола получения БМКП аутологичных МСК для дальнейшего применения в клеточной терапии этих пациентов.

Материал и методы исследования

БМКП МСК получали из аутологичного костного мозга пациентов с ЛУ-ТБ. В качестве контроля использовали БМКП МСК из костного мозга здоровых лиц, которые являлись донорами для проведения клеточной терапии МСК при различных патологиях.

Экспузию костного мозга в объеме 60-80 мл у пациентов и доноров проводили посредством костномозговой пункции под анестезией. Мононуклеарные клетки выделяли на Гистопакке плотностью 1,077 (Sigma, США), отмывали в 0,9% растворе NaCl, ресуспендировали в среде Дульбекко в модификации Искова (IMDM) с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС), переносили в концентрации $2-3 \times 10^6$ /мл во флакон объемом 175 см³ и инкубировали при 37° в 5% CO₂. При 70-90% покрытии поверхности флакона прикрепленными клетками их дезаггезировали при помощи 0,25% трипсин-ЭДТА. Полученную первичную культуру МСК рассаживали (1-ый пассаж) и культивировали при разных условиях: в среде IMDM с 10% ЭТС или в среде IMDM с добавлением 5% ЛТ и гепарина. Экспансию МСК для получения БМКП продолжали на протяжении 3 пассажей.

Лизат тромбоцитов получали из концентрата тромбоцитов, выделенных методом афереза из периферической крови здоровых доноров, переносили в гемафризный пакет и замораживали до -20°С с последующим размораживанием в водяной бане при 37°С. Пакет с размороженным материалом резко охлаждали в парах жидкого азота в течение 30 минут. Процедуру замораживания/размораживания с резкой сменой температуры повторяли 4-5 раз, что приводило к полному разрушению клеток. Материал центрифугировали при 2000 об/мин и отбирали надосадочную жидкость – ЛТ.

Иммунофенотипический анализ МСК проводили с использованием набора MSC Phenotyping Kit, human (Miltenyi Biotec, Германия), включающий коктейль меченных флуорохромами антител к CD73, CD90, CD105, по которым МСК позитив-

ны, и антител к CD14, CD45, CD34, CD19, характерных для гемопоэтических клеток, но экспрессия которых отсутствует на МСК. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре NAVIOS (Beckman Coulter) в программе CellQuestPro. В образце анализировали не менее 100 тыс. клеток.

Жизнеспособность клеток определяли добавлением к 20 мкл клеточной суспензии 20 мкл трипанового синего, инкубацией клеток с красителем в течение 5 минут и последующим подсчетом количества живых клеток (не окрашенных) и мертвых (окрашенных) в гемоцитометре под световым микроскопом. Общее количество подсчитанных клеток – не менее 100. Жизнеспособность клеток выражали в %.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы STATISTICA 6 и включала методы описательной статистики с определением медианы, среднего значения и стандартной ошибки среднего значения. Достоверность различий между независимыми группами оценивали с помощью Mann-Whitney U теста для непараметрического анализа.

Результаты исследования

Характер роста МСК из костного мозга пациентов с ЛУ-ТБ. Нами был проведен сравнительный анализ параметров получения БМКП МСК из костного мозга 42 пациентов с ЛУ-ТБ в возрасте 32,5 (19-59 лет) с аналогичными показателями БМКП МСК из костного мозга 47 доноров сопоставимого возраста 36 (18-55) лет. БМКП в обоих случаях получали, используя единый протокол. Оценивали: объем костного мозга (VK.M.); количество мононуклеарных клеток, выделенных из КМ (МНК $\times 10^6$); срок культивирования МСК в первичной культуре; число МСК на выходе из первичной культуры; срок до получения БМКП МСК (срок культивирования); количество МСК в БМКП для введения (МСКБМКП $\times 10^6$); количество МСК на 10^3 МНК КМ (МСКБМКП/1000 МНК); количество МСК в единице объема КМ (МСКБМКП/мл КМ) (таблица 1).

Таблица 1 – Параметры экспансии *in vitro* МСК из костного мозга пациентов с ЛУ-ТБ и доноров

Параметры	Пациенты с ЛУ-ТБ	Доноры	Достоверность различий (p)
	n= 42	n = 47	
V _{км} (мл)	70,0 (40,0-125,0)	65,0 (35,0-135,0)	p=0,7167
МНК ×10 ⁶	300 (96,7-570,3)	250,0 (90,0-1220,0)	p=0,7578
Срок в первичной культуре	14,0 (9,0-25,0)	14,0 (8,0-20,0)	p=0,1418
МСК _{первичная культура} ×10 ⁶	10,0 (2,7-26,0)	10,5 (2,5-60)	p=0,4369
Срок культивирования	35,0 (21,0-61,0)	30,0 (20,0-41,0)	p=0,0014
МСК _{БМКП} ×10 ⁶	61,5 (11,0-135,0)	72,0 (38,0-158,0)	p=0,0149
МСК _{БМКП} /1000 МНК	196,9 (27,5-1350,0)	256,7 (100,7-800,0)	p=0,0444
МСК _{БМКП} /мл КМ ×10 ⁶	0,9 (0,18-2,5)	1,2 (0,6-2,5)	p=0,0109

Сравнительный анализ показал, что из одинакового количества моноклеарных клеток, выделенных из КМ пациентов с ЛУ-ТБ ($300,25 \pm 18,5 \times 10^6$) и доноров ($320,72 \pm 31,6 \times 10^6$), на выходе БМКП доноров содержал достоверно больше МСК, чем БМКП пациентов – $77,41 \pm 3,5 \times 10^6$ и $63,33 \pm 4,43 \times 10^6$, соответственно ($p=0,0149$). Количество МСК в клеточном продукте на 1000 МНК костного мозга у доноров также было выше, чем в группе с ЛУ-ТБ ($p=0,0444$). Полученные результаты свидетельствуют о сниженной пролиферативной активности МСК у пациентов с ЛУ-ТБ в процессе культивирования. Так, если для получения первичной культуры срок культивирования МСК между группами не отличался (14 дней) и число МСК в культуре было сопоставимо, то при дальнейшем культивировании с проведением 3 пассажей экспансия МСК доноров была выше и получение БМКП 3-го пассажа проходило на 5 суток быстрее ($p=0,0014$). Отмечено, что при получении МСК из костного мозга пациентов с ЛУ-ТБ количество МСК в первичной культуре не коррелирует с числом моноклеарных клеток костного мозга, из которых они выделены ($r=0,017$), в то время как в контрольной группе наблюдается достоверная корреляция между этими двумя параметрами ($r=0,7413$, $p<0,05$). Число МСК, полученных из 1 мл КМ доноров, было больше, чем из КМ пациентов с ЛУ-ТБ ($p=0,0109$), что может иметь практическое значение, так как предполагает проводить забор материала костного мозга у пациентов в большем объеме для получения БМКП МСК.

Для пациентов с ЛУ-ТБ была установлена зависимость между количеством МСК в первичной культуре и количеством МСК в БМКП на выходе ($r=0,58$, $p<0,05$).

Влияние различных условий культивирования на экспансию МСК из костного мозга пациентов с ЛУ-ТБ. Наличие корреляции между числом МСК в первичной культуре и конечного числа МСК в БМКП при культивировании в среде IMDM с 10% ЭТС дало основание для подбора оптимальных условий культивирования низко пролиферирующих МСК при дальнейшей экспансии *in vitro*. Так, дальнейшие условия экспансии после 1-го пассажа для хорошо делящихся МСК, количество которых в первичной культуре было больше 9×10^6 , сохраняли и клетки росли в среде с 10% ЭТС (группа 1), в то время как при получении МСК в первичной культуре меньше 9×10^6 проводили замену 10% ЭТС на 5% ЛТ (Группа 2). Результаты параметров роста МСК обеих групп отображены в таблице 2.

Как показывают наши данные, исходные параметры для получения МСК: объем костного мозга, количество выделенных моноклеарных клеток в двух исследуемых группах не отличались. В группе 1 в среднем в основной культуре получили $13,54 \pm 0,79 \times 10^6$ МСК, тогда как в группе 2 – только $6,47 \pm 0,51 \times 10^6$ ($p=0,0001$). Результаты дальнейшей экспансии МСК с 1 по 3 пассаж в разных средах культивирования продемонстрировали, что МСК группы 2, которые показывали слабый рост в среде с ЭТС, хорошо пролиферировали при переходе на 5% ЛТ. Так, при сравнении количе-

Таблица 2 – Основные параметры получения БМКП МСК пациентов с ЛУ-ТБ

Параметры	Компоненты среды для культивирования		Достоверность различий (p)
	ЭТС	ЛТ	
Количество пациентов (n)	23	19	
$V_{к.м.}$ (мл)	70,0 (55,0-100,0)	81,0 (45,0-101,0)	>0,05
МНК $\times 10^6$	320 (140,0-472,0)	250,0 (130,0-528,0)	>0,05
Срок в первичной культуре	13,0 (9,0-20,0)	14,0 (12,0-20,0)	>0,05
МСК $\times 10^6$	12,1 (9,5-26,0)	7,0 (2,0-9,0)	0,0001
Дни культивирования	30,0 (21,0-43,0)	34,0 (24,0-50,0)	>0,05
МСК $\times 10^6$	87,0 (24,0-165,0)	70,0 (30,0-150,0)	>0,05

Таблица 3 – Характеристика иммунофенотипа и жизнеспособности клеток в БМКП МСК

Компоненты среды	ЖСП (%)	Имунофенотип клеток			
		CD90	CD105	CD73	CD45/CD14/CD34
ЭТС	99 (98-100)	98,6 (91,8-99,2)	97,3 (92,5-99,1)	98,3 (93,2-99,2)	0,79 (0,17-4,3)
ЛТ	99 (97-100)	96,9 (89,3-99,5)	95,7 (84,8-98,5)	97,8 (87,6-99,0)	0,79 (0,4-3,0)
Достоверность различий (p)	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

ства клеток в БМКП МСК на выходе после 3-х пассажей их число было сопоставимо в обеих группах и составляло $83,19 \pm 6,52 \times 10^6$ и $75,53 \pm 7,55 \times 10^6$. Более того, прирост МСК при культивировании с 1 по 3 пассаж в среде с 5% ЛТ был в 2 раза выше, чем в среде с ЭТС ($p=0,014$) (рисунок 1).

Аналогичные данные стимулирующего воздействия ЛТ на пролиферацию МСК отмечали и другие исследователи, показав, что ЛТ сокращает время удвоения клеток в 2 и более раз [10].

Анализ иммунофенотипа и жизнеспособности клеток показал, что клетки в БМКП, культивированные как в присутствии ЭТС, так и в присутствии ЛТ, имеют фенотип, характерный для МСК. Жизнеспособность клеток в БМКП также не отличалась в обоих случаях и была >97% (таблица 3).

Заключение

Установлено, что МСК, выделенные из костного мозга пациентов с ЛУ-ТБ, обладают более низкой пролиферативной активностью и потенциалом к экспансии *in vitro* по сравнению с МСК доноров, что осложняет получение высокой дозы аутологичных МСК для клеточной терапии. Анализ пока-

зал более низкое содержание МСК в 1 мл костного мозга пациентов с ЛУ-ТБ, чем у доноров, что имеет практическое значение, так как предполагает проведение эксфузии костного мозга у пациентов в большем объеме для получения БМКП МСК.

Выявлена зависимость между количеством МСК в первичной культуре и в конечном БМКП при росте клеток в среде с 10% ЭТС, что явилось основанием для оптимизации условий экспансии клеток, и в случае их слабой пролиферации в первичной культуре перехода на дальнейшее

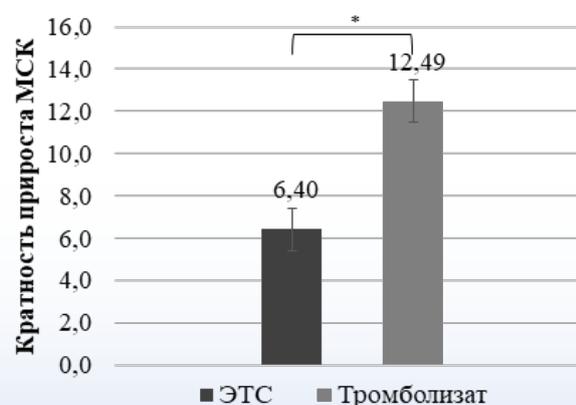


Рисунок 1 – Прирост МСК при экспансии клеток в среде с ЭТС и в среде с лизатом тромбоцитов с 1 по 3 пассаж, * – $p<0,05$

культивирование в среде с 5% лизатом тромбоцитов. Комбинация различных условий культивирования позволила получить терапевтически эффективную дозу аутологичных МСК и может быть предложена для создания аутологичного БМКП при проведении клеточной терапии пациентам, получавшим химиотерапию.

Библиографический список

1. Secretome of Mesenchymal Stromal Cells Prevents Myofibroblasts Differentiation by Transferring Fibrosis-Associated microRNAs within Extracellular Vesicles // N. Basalova, [et al.] / Cells. – 2020. – Vol. 9, № 5. <https://doi.org/10.3390/cells9051272>.
2. Mora, A.L. Aging and lung injury repair: a role for bone marrow derived mesenchymal stem cells // A.L. Mora, M. Rojas. / J Cell Biochem. – 2008. – Vol. 105. – P. 641-647.
3. Allogeneic Human Mesenchymal Stem Cells in Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis via Intravenous Delivery (AETHER): A Phase I Safety Clinical Trial / M.K. Glassberg [et al.] // Chest. – 2017. – Vol. 151. – P. 971-981.
4. Mesenchymal stem cells secrete immunologically active exosomes // Zhang B [et al.] / Stem Cells Dev. – 2014. – Vol.23, №11. – P. 1233-1244.

5. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival *in vivo* // A.Bartholomew [et al.] / Exp. Hematol. – 2002. – Vol. 30. – P. 42-48.

6. Mesenchymal stem cells inhibit proliferation of lymphoid origin haematopoietic tumour cells by inducing cell cycle arrest / V. H. Sarmadi [et al.] // Med. J. Malaysia. – 2010. – Vol. 65, № 3. – P. 209-214.

7. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion / J. Gao [et al.] // Cells. – 2001. – Vol.169, №1. – P.12-20.

8. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the antiinflammatory protein TSG-6 / R.H. Lee [et al.] // Cell Stem Cell. – 2009. – V.5. – P. 54-63.

9. Systemic and local delivery of mesenchymal stem cells for heart renovation: challenges and innovations / Z. Liu [et al.] // Eur J Pharmacol. – 2020. – Vol. 876. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173049>.

10. Ростстимулирующая активность препаратов тромбоцитов в отношении мезенхимальных стволовых клеток *in vitro* / С.И. Игнатенко, С.М. Космачева, М.П. Потапнев // Весці/Известия НАНБ, сер. мед. наук. – 2016. – Т. 1. – С. 52-58.

11. Platelet lysate consisting of a natural repair proteome supports human mesenchymal stem cell proliferation and chromosomal stability / R. Crespo-Diaz [et al.] // Cell Transpl. – 2011. – Vol.20. – P. 797-811. <https://doi.org/10.3727/096368910X543376>

Y. Isaikina, V. Solodovnikova, R. Frolova, U. Savich, H. Zhernasechanka, A. Skrahina

MESENCHYMAL STEM CELLS FROM BONE MARROW OF PATIENTS WITH DRUG-RESISTANT TUBERCULOSIS FOR CELLULAR THERAPY

In this study, we evaluated the proliferative capacity of mesenchymal stem cells (MSCs) from the bone marrow of patients with drug-resistant tuberculosis (DR-TB) and selected the optimal conditions for obtaining autologous MSCs transplant. The results of the expansion of MSCs from 42 patients with DR-TB in medium with 10% FBS demonstrated low proliferative potential for of these cells compared with MSCs from 47 donors. MSCs content in 1 ml of bone marrow of patients was also lower. A relationship was found between the amount of MSCs in the primary culture and in the finished product, and with a small number of cells in the primary culture, we used 5% platelet lysate instead of 10% FTS, which made it possible to obtain a high dose of MSCs in the transplant.

Key words: *mesenchymal stem cells, drug-resistance tuberculosis*

Поступила 21.04.23