

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ В.А. Ходжаев

3 декабря 2010 г.

Регистрационный № 111-1010

**МЕТОД ОЦЕНКИ ИММУНОСУПРЕССИВНЫХ СВОЙСТВ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА
ПАЦИЕНТОВ С РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

ГУ «Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. М.М. Зафранская, д-р. мед. наук., проф. А.С. Федулов, канд. биол. наук. Д.Б. Нижегородова, Я.М. Мотузова, М.Ю. Юркевич, С.С. Багатка, Г.И. Иванчик, канд. биол. наук А.П. Власов, канд. биол. наук Г.В. Кожух, канд. мед. наук Н.Ф. Миланович

Минск 2010

Инструкция содержит клинико-лабораторные рекомендации по определению *in vitro* способности мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга 1 и 2-го пассажей ингибировать пролиферацию CD3⁺CD45RO⁺Т-клеток памяти периферической крови пациентов с рассеянным склерозом (РС) для оценки возможности дальнейшего использования культур МСК в качестве клеточного трансплантата. Технология основана на использовании совместного культивирования аутологичных/аллогенных МСК и мононуклеаров периферической крови (МПК) в присутствии поликлонального митогена фитогемагглютинаина (ФГА) и/или миелинового аутоантигена рекомбинантного миелинолигодендроцитарного гликопротеина (pМОГ₁₋₁₂₅) с последующей оценкой пролиферативного ответа Т-клеток памяти в культуре МПК и ко-культуре МПК с МСК, на основе которой рассчитывается коэффициент супрессии (*k*). Рекомендации включают алгоритм отбора пациентов с РС на основе общего клинического, неврологического и инструментального обследования, технологию лабораторной оценки пролиферации Т-клеток памяти, культивируемых в условиях стимуляции ФГА/pМОГ₁₋₁₂₅ в присутствии и отсутствии МСК, и расчет коэффициента супрессии *k* антиген-неспецифической/антиген-специфической пролиферации Т-клеток памяти.

Инструкция рассчитана на иммунологов, неврологов, трансплантологов, гематологов и врачей клинической лабораторной диагностики.

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

Уровень внедрения: специализированные отделения и РНПЦ.

Инструкция разработана в рамках научно-исследовательской работы «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» темы-задания 1.21 ГКПНИ «Современные технологии в медицине» (№ гос. рег. 20081618).

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, МАТЕРИАЛОВ И РЕАКТИВОВ

Оборудование

1. Ламинарный бокс (не ниже II класса).
2. Центрифуга с охлаждением (1500 об/мин).
3. Гематологический анализатор.
4. CO₂-инкубатор.
5. Проточный цитофлуориметр.
6. Шейкер.
7. Инвертированный микроскоп.
8. Холодильник +4°C.
9. Морозильник -20°C.
10. Набор автоматических дозаторов переменного объема 2–5000 мкл.

Материалы

1. Стерильные центрифужные пробирки объемом 15 мл.
2. Стерильные центрифужные пробирки объемом 50 мл.
3. Пробирки для проточной цитофлуориметрии объемом 4 мл.
4. Стерильные чашки Петри диаметром 60 мм с поверхностью для адгезивных культур.
5. Стерильные 96-луночные культуральные планшеты.
6. Стерильные наконечники для дозаторов.

Реактивы

1. Гепарин (5000 Ед/мл).
2. Градиент плотности Histopaque-1077 ($\rho=1,077$ г/см³).
3. Фосфатный буферный раствор (PBS).
4. Культуральная среда DMEM-LG с 25мМ HEPES.
5. Культуральная среда RPMI-1640 с 25мМ HEPES.

6. Эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС), инактивированная (30 мин при 56°C).
7. Раствор антибиотика-антимикотика (5 мг/мл пенициллина, 5 мг/мл стрептомицина, 10 мг/мл неомицина).
8. Раствор 200 мМ L-глутамина.
9. Раствор 0,25% трипсин-ЭДТА.
10. Рекомбинантный человеческий интерлейкин-2 (ИЛ-2, 100 000 Ед).
11. Поликлональный митоген фитогемагглютинин (ФГА, 5 мг).
12. Рекомбинантный миелин-олигодендроцитарный гликопротеин с аминокислотной последовательностью 1-125 (pMOG₁₋₁₂₅, 1 мг).
13. 5(6)-карбоксифлуоресцеин диацетат N-сукцинимидил эфира (CFSE, 25 мг).
14. Диметилсульфоксид (DMSO).
15. Моноклональные антитела к поверхностным маркерам Т-клеток памяти — CD3, CD45RO и поверхностным маркерам МСК — CD90, CD105, CD44, CD119, CD45, CD34, CD31, CD14.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Верифицированный диагноз рассеянного склероза на основании критериев McDonald et al. (2005).
2. Рецидивно-ремиттирующий и прогрессивно-ремиттирующий тип течения заболевания.
3. Возраст 18–50 лет.
4. Продолжительность заболевания от 1 года до 10 лет.
5. Количество баллов по расширенной шкале инвалидизации по Куртцке (EDSS) от 1 до 6,5 балла;
6. Прогрессирование заболевания, частые обострения или ухудшение по данным МРТ в течение 1 года:

- ухудшение неврологического статуса за последний год ≥ 1 балла по шкале EDSS (если исходный уровень EDSS составлял ≤ 5 баллов) либо на 0,5 балла (если исходный уровень EDSS составлял $\geq 5,5$ баллов);
 - увеличение, как минимум, на 1 балл по шкале EDSS от исходного уровня EDSS ≥ 1 которое сохраняется в течение 12 недель, либо увеличение на 1,5 балла по шкале EDSS от исходной оценки по EDSS = 0, которое сохраняется в течение 12 недель;
 - одно или более обострений умеренной выраженности за последние 18 мес.;
 - один и более очагов, накапливающих контраст по данным МРТ с внутривенным усилением;
 - один и более новых очагов на T2 режиме МРТ.
7. Отсутствие иммуномодулирующего или иммуносупрессивного лечения в течение 6 мес. до забора биологического материала;
 8. Отсутствие лечения глюкокортикостероидами в течение 1 мес. до забора биологического материала.
 9. Нормальные возрастно-половые показатели клинико-лабораторного обследования.
 10. Наличие подписанного добровольного информированного согласия пациента на применение технологии трансплантации.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Тяжелые сопутствующие заболевания (застойная сердечная недостаточность, нестабильная стенокардия, нарушение ритма сердца и проводимости миокарда, инфаркт миокарда, пневмония, почечная и печеночная недостаточность, сепсис, кровотечения, психические нарушения, декомпенсированный сахарный диабет, физическая несостоятельность, кахексия, онкологические заболевания).
2. Наличие острого либо обострение хронического воспалительного процесса любой локализации.

3. Беременность и кормление грудью.
4. Выраженные отклонения от нормальных возрастно-половых показателей клинико-лабораторного обследования.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРЕДЛАГАЕМОГО МЕТОДА

1.1. Перечень необходимых клинико-лабораторных исследований

При подготовке к оценке иммуносупрессивных свойств МСК пациентов с РС необходимо провести следующие клинико-лабораторные исследования и манипуляции:

1. осмотр невролога.
2. Клинико-лабораторные обследования (табл. 1)
3. Осмотр трансплантолога.
4. Забор биологического материала: получение пунктата костного мозга (стерильная пункция, трепанобиопсия) и периферической венозной крови.

Таблица 1

Перечень клинико-лабораторных обследований, проводимых пациенту с рассеянным склерозом при подготовке к аутологичной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток

1. Общий анализ крови
2. Биохимический анализ крови
3. Общий анализ мочи
4. Коагулограмма (по показаниям)
5. УЗИ органов брюшной полости (по показаниям)
6. Р-графия органов грудной клетки
7. ФГДС (по показаниям)
8. Осмотр стоматолога (по показаниям)
9. Осмотр отоларинголога (по показаниям)
10. ЭКГ
11. Осмотр гинеколога (для женщин)
12. Вирусологическое обследование (гепатит В, С, вирус простого герпеса,

- цитомегаловирус, вирус Эпштейна–Барр) (по показаниям)
13. RW, СПИД (по показаниям)
 14. ЭхоКГ (по показаниям)
 15. МРТ головного мозга с контрастным усилением
 16. Онкомаркеры (по показаниям)

1.2. Программа основного протокола

Программа основного протокола иммунологической оценки способности МСК костного мозга супрессировать антиген-неспецифическую и миелин-индуцированную пролиферацию $CD3^+CD45RO^+$ Т-клеток памяти периферической крови у пациентов с РС состоит из следующих этапов:

1. Выделение мононуклеаров из пунктата костного мозга и периферической крови.
2. Культивирование мононуклеаров костного мозга для получения гомогенной культуры МСК 1 или 2-го пассажей.
3. Фенотипическая характеристика МСК.
4. Окрашивание МПК внутриклеточным флуоресцентным красителем 5(6)-карбоксихлорофлуоресцеин диацетат N-сукцинимидил эфиром (CFSE).
5. Культивирование окрашенных МПК в условиях митогенной (ФГА) или миелин-специфической (pMOG₁₋₁₂₅) стимуляции в присутствии или отсутствии аутологичных и/или аллогенных МСК 1 или 2-го пассажей в соотношении 10:1.
6. Оценка антиген-неспецифической и антиген-специфической пролиферации $CD3^+CD45RO^+$ Т-клеток-памяти, культивируемых в кокультурах МПК с и без МСК, методом проточной цитофлуориметрии.
7. Расчет коэффициента супрессии k ФГА/pMOG₁₋₁₂₅-индуцированной пролиферации Т-клеток памяти.

1.3. Приготовление рабочих растворов

Полная культуральная среда RPMI-1640: культуральная среда RPMI-1640 с 25мМ HEPES, 2мМ L-глутамина, 10% инактивированной ЭТС и 1% антибиотиком-антимикотиком.

Полная культуральная среда DMEM-LG: культуральная среда DMEM-LG с 25мМ HEPES, 2мМ L-глутамина, 10% инактивированной ЭТС и 1% раствор антибиотика-антимикотика.

Маточный и рабочий растворы флуоресцентного красителя CFSE: 25 мг флуоресцентного красителя CFSE растворить в DMSO для получения маточного раствора концентрацией 7 мМ, разлить по аликвотам, заморозить при -20°C. Для получения рабочего раствора CFSE разводить маточный раствор культуральной средой RPMI-1640. Конечная используемая концентрация для окрашивания 1×10^7 МПК/мл культуральной среды RPMI-1640 составляет 7 мкМ CFSE.

Маточный и рабочий растворы митогена ФГА: 5 мг ФГА растворить в 5 мл полной культуральной среды RPMI-1640 для получения маточного раствора концентрацией 1 мг/мл, разлить по аликвотам, заморозить при -20°C. Для получения рабочего раствора ФГА разводить маточный раствор средой RPMI-1640. Конечная используемая концентрация митогена — 2,5 мкг/мл.

Маточный и рабочий растворы миелинового антигена рМОГ₁₋₁₂₅: 1 мг лиофилизированного рМОГ₁₋₁₂₅ растворить в 1 мл полной культуральной среды RPMI-1640 для получения маточного раствора концентрацией 1 мг/мл, разлить по аликвотам, заморозить при -20°C. Для получения рабочего раствора рМОГ₁₋₁₂₅ разводить маточный раствор средой RPMI-1640. Конечная используемая концентрация миелинового аутоантигена — 10 мкг/мл.

Маточный и рабочий растворы ИЛ-2: 100 000 Ед ИЛ-2 растворить в 1 мл полной культуральной среды RPMI-1640 для получения маточного раствора в концентрации 100 000 Ед/мл, разлить по аликвотам, заморозить при -20°C. Для получения рабочего раствора ИЛ-2 развести маточный раствор средой RPMI-1640. Конечная используемая концентрация ИЛ-2 — 10 Ед/мл.

1.4. Выделение мононуклеаров из периферической крови и пунктата костного мозга

Все этапы забора биологического материала и выделения мононуклеарных клеток необходимо выполнять в стерильных условиях. Периферическую кровь и пунктат красного костного мозга отобрать в стерильные пробирки с добавлением 20 ЕД/мл гепарина.

Для выделения мононуклеарных клеток пунктат костного мозга или цельную венозную периферическую кровь пациента с РС смешать с равным объемом PBS и наслоить на градиент плотности Histopaque-1077 ($\rho=1,077 \text{ г/см}^3$) в соотношении 2:1. Центрифугировать 30 мин при 1500 об/мин при температуре $+4^\circ\text{C}$. Интерфазное кольцо МПК перенести в отдельную стерильную пробирку с 10 мл культуральной среды RPMI-1640, а интерфазное кольцо мононуклеаров костного мозга перенести в отдельную стерильную пробирку с 10 мл культуральной среды DMEM-LG и центрифугировать 10 мин при 1500 об/мин и температуре $+4^\circ\text{C}$. Удалить супернатант, ресуспендировать осадок мононуклеаров в соответствующей культуральной среде и повторно центрифугировать 10 мин при 1500 об/мин при температуре $+4^\circ\text{C}$. Удалить супернатант, ресуспендировать осадок МПК в культуральной среде RPMI-1640 в концентрации 1×10^7 кл./мл, а осадок мононуклеаров костного мозга в полной культуральной среде DMEM-LG в концентрации $1,25\text{--}1,5 \times 10^6$ клеток/мл.

Выделенные МПК могут быть непосредственно использованы для постановки совместного культивирования с МСК. Выделенные мононуклеары костного мозга используются для получения первичной культуры и ранних (1 или 2-го) пассажей МСК.

1.5. Получение МСК из мононуклеаров костного мозга

Мононуклеары костного мозга, ресуспендированные в полной культуральной среде DMEM-LG в концентрации $1,25\text{--}1,5 \times 10^6$ кл./мл, засеять в стерильные чашки Петри с адгезивным покрытием диаметром 60 мм в объеме 4 мл клеточной суспензии на чашку Петри, что соответствует плотности посева $1,8\text{--}2,1 \times 10^5$ клеток/см². Чашки Петри культивировать в CO₂-инкубаторе при

37°C, 5% CO₂ и 99% влажности воздуха. Через 24 ч после посева и в дальнейшем каждые 3-4-е сут. осуществлять смену полной культуральной среды DMEM-LG.

Первичную культуру МСК мониторировать с использованием инвертированного микроскопа для определения конфлюэнтности монослоя клеток. По достижении первичной культуры МСК 70–80% конфлюэнтности удалить клеточный супернатант, промыть чашку Петри 4 мл PBS и залить 1 мл раствора 0,25% трипсин/ЭДТА для открепления клеток с поверхности культурального пластика. Инкубировать 15 мин в CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂ и 99% влажности воздуха).

Для остановки реакции трипсинизации в чашку Петри добавить 4 мл культуральной среды DMEM-LG, содержащей 10% ЭТС. Тщательно ресуспендировать открепившиеся МСК и перенести в отдельную стерильную пробирку. Довести объем клеточной суспензии до 10 мл полной культуральной средой DMEM-LG и центрифугировать 10 мин при 1500 об/мин и температуре +4°C. Удалить супернатант, ресуспендировать клеточный осадок в полной культуральной среде DMEM-LG и повторно центрифугировать 10 мин при 1500 об/мин и температуре +4°C. Удалить супернатант, ресуспендировать осадок первичной культуры МСК в полной культуральной среде DMEM-LG в концентрации $1,25-1,5 \times 10^4$ кл./мл.

Для получения МСК 1-го пассажа засеять полученную клеточную суспензию первичной культуры МСК в стерильные чашки Петри с адгезивным покрытием диаметром 60 мм в объеме 4 мл клеточной суспензии на чашку Петри, что соответствует плотности посева $1,8-2,1 \times 10^3$ кл/см². Чашки Петри культивировать в CO₂-инкубаторе (при 37°C, 5% CO₂ и 99% влажности воздуха). Каждые 3–4-е сутки осуществлять смену полной культуральной среды DMEM-LG. По достижении 1-го пассажа МСК 70–80% конфлюэнтности снять клеточную культуру путем трипсинизации (см. выше). МСК 2-го пассажа получают аналогичным способом из клеточной культуры МСК 1-го пассажа.

Полученный клеточный осадок МСК 1 или 2-го пассажей ресуспендировать в полной культуральной среде RPMI-1640 в концентрации 2×10^5 кл/мл и использовать для постановки реакции совместного культивирования.

1.6. Фенотипическая характеристика МСК

Фенотип полученных культур МСК костного мозга 1 или 2-го пассажей определяется методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител к следующим поверхностным маркерам: CD90, CD105, CD44, CD119, CD45, CD34, CD31, CD14.

Для фенотипирования МСК в концентрации 1×10^5 кл/200 мкл полной культуральной среды RPMI-1640 перенести в пробирку для проточной цитометрии и инкубировать с моноклональными антителами (10 мкл на 1 пробу) в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре. После окончания инкубации клетки осадить центрифугированием в течение 5 мин при 1500 об/мин, удалить супернатант и ресуспендировать клеточный осадок в 400 мкл PBS. Измерения выполнять на проточном цитофлуориметре. МСК 1 и 2-го пассажа имеют фенотип $CD90^+/CD105^+/CD44^+/CD119^+/CD45^-/CD34^-/CD31^-/CD14^-$.

1.7. Окрашивание МПК внутриклеточным флуоресцентным красителем CFSE (CFSE-метод)

Перед совместным культивированием МПК предварительно окрашиваются внутриклеточным красителем CFSE. По изменению интенсивности его флуоресценции после окончания культивирования оценивается количество поделившихся клеток.

Для окрашивания 1×10^7 МПК ресуспендировать в 1 мл культуральной среды RPMI-1640 и добавить CFSE-препарат в конечной концентрации 7 μ M. Инкубировать 5 мин в темноте при комнатной температуре. Реакцию окрашивания останавливать путем добавления охлажденной до +4°C полной культуральной среды RPMI-1640. Центрифугировать 10 мин при 1500 об/мин и температуре +4°C. Удалить супернатант, ресуспендировать клеточный осадок

окрашенных МПК в полной культуральной среде RPMI-1640 и повторно центрифугировать 10 мин при 1500 об/мин и температуре +4°C. Удалить супернатант, ресуспендировать осадок окрашенных МПК в полной культуральной среде RPMI-1640 в концентрации 4×10^6 кл./мл.

1.8. Совместное культивирование МСК и МПК

Схема 5-дневного совместного культивирования МСК и МПК в 96-луночном планшете представлена на рис. 1. В лунки А1–А3 добавить МПК в концентрации 2×10^5 кл./200 мкл полной культуральной среды RPMI-1640 без добавления антигенов. В лунки В1–В3 добавить МПК в концентрации 2×10^5 кл./200 мкл полной культуральной среды RPMI-1640, содержащей неспецифический поликлональный митоген ФГА в конечной концентрации 2,5 мкг/мл. В лунки С1–С3 добавить МПК в концентрации 2×10^5 клеток и МСК в концентрации 2×10^4 клеток (соотношение 10:1) в 200 мкл полной культуральной среды RPMI-1640, содержащей ФГА в конечной концентрации 2,5 мкг/мл.

После внесения компонентов инкубировать планшет в CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂ и 99% влажность воздуха в течение 5 сут.).

Рис. 1. Схема 5-дневного совместного культивирования МПК и МСК
Примечание: МПК–мононуклеары периферической крови; МСК– аутологичные/аллогенные мезенхимальные стволовые клетки 1 или 2-го пассажей; ФГА–фитогемагглютинин; 1-3–вертикальное обозначение лунок планшета; А-С– горизонтальное обозначение лунок планшета

	1	2	3
А	2×10^5 МПК	2×10^5 МПК	2×10^5 МПК
В	2×10^5 МПК 2,5 мкг/мл ФГА	2×10^5 МПК 2,5 мкг/мл ФГА	2×10^5 МПК 2,5 мкг/мл ФГА
С	2×10^5 МПК 2,5 мкг/мл ФГА 2×10^4 МСК	2×10^5 МПК 2,5 мкг/мл ФГА 2×10^4 МСК	2×10^5 МПК 2,5 мкг/мл ФГА 2×10^4 МСК

Схема 10-дневного совместного культивирования МСК и МПК в 96-луночном планшете представлена на рис. 2. В лунки А1–А№ добавить МПК в концентрации 2×10^5 клеток в 200 мкл полной культуральной среды RPMI-

1640 добавления. В лунки В1–В3 добавить МПК в концентрации 2×10^5 клеток в 200 мкл полной культуральной среды RPMI-1640, содержащей миелиновый аутоантиген рМОГ₁₋₁₂₅ в конечной концентрации 10 мкг/мл. В лунки С1-С3 добавить МПК в концентрации 2×10^5 клеток и МСК в концентрации 2×10^4 клеток (соотношение 10:1) в 200 мкл полной культуральной среды RPMI-1640, содержащей рМОГ₁₋₁₂₅ в конечной концентрации 10 мкг/мл.

После внесения компонентов инкубировать планшет в CO₂-инкубаторе (37⁰С, 5% CO₂ и 99% влажность воздуха в течение 10 сут.).

Рис. 2. Схема 10-дневного совместного культивирования МПК и МСК
Примечание: МПК–моноклеары периферической крови; МСК– аутологичные/аллогенные мезенхимальные стволовые клетки 1 или 2-го пассажей; рМОГ₁₋₁₂₅–миелинолигодендроцитарный гликопротеин с аминокислотной последовательностью 1-125; 1-3–вертикальное обозначение лунок планшета; А-С– горизонтальное обозначение лунок планшета

	1	2	3
А	2×10^5 МПК	2×10^5 МПК	2×10^5 МПК
В	2×10^5 МПК 10 мкг/мл рМОГ ₁₋₁₂₅	2×10^5 МПК 10 мкг/мл рМОГ ₁₋₁₂₅	2×10^5 МПК 10 мкг/мл рМОГ ₁₋₁₂₅
С	2×10^5 МПК 10 мкг/мл рМОГ ₁₋₁₂₅ 2×10^4 МСК	2×10^5 МПК 10 мкг/мл рМОГ ₁₋₁₂₅ 2×10^4 МСК	2×10^5 МПК 10 мкг/мл рМОГ ₁₋₁₂₅ 2×10^4 МСК

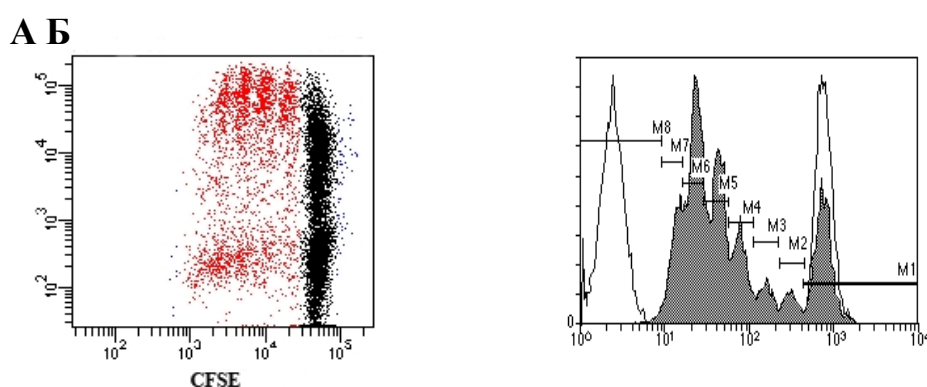
На 6-е сут. отобрать половину среды (100 мкл) из лунок планшета с 10-дневным совместным культивированием и добавить 100 мкл полной культуральной среды RPMI-1640, содержащей ИЛ-2 в конечной концентрации 10 Ед/мл.

1.9. Оценка антиген-неспецифической и антиген-специфической пролиферации Т-клеток памяти в ко-культурах МПК с и без МСК методом проточной цитофлуориметрии

После 6 и 10-дневного культивирования клеточные суспензии из каждой лунки перенести в пробирки для проточной цитометрии и добавить по 10 мкл на 1 пробу моноклональных антител к поверхностным маркерам Т-клеток памяти: CD3 (маркер Т-лимфоцитов) и CD45RO (маркер Т-клеток памяти).

Инкубировать в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре. После окончания инкубации клетки осадить центрифугированием в течение 5 мин при 1500 об/мин, удалить супернатант и ресуспендировать клеточный осадок в 400 мкл PBS. Измерения выполнять на проточном цитофлуориметре.

Рис. 3. Количественный анализ клеточного деления по включению CFSE.
Примечание: А–точечная диаграмма, отображающая неподелившиеся $CFSE^{high}$ T-лимфоциты (события черного цвета) и поделившиеся $CFSE^{low}$ T-лимфоциты (события красного цвета), Б–проекция точечной диаграммы А (гистограмма), отображающей количество клеточных делений: неподелившиеся $CFSE^{high}$ T-лимфоциты (M1) и поделившиеся $CFSE^{low}$ T-лимфоциты (M2–M8)



Для оценки пролиферативного ответа в соответствии с распределением флуоресценции установить границы популяции $CD3^+$ T-клеток среди живых лимфоцитов, в пределах которой выделить субпопуляцию $CD3^+CD45RO^+$ T-клеток памяти. Пролиферацию T-клеток памяти оценивать по интенсивности флуоресценции внутриклеточного красителя CFSE в диапазоне флуорохрома флуоресцинизоцианата–FITC (спектр излучения ~ 521 нм). Метод количественного анализа клеточного деления основан на том, что в процессе каждого деления флуоресценция клетки уменьшается в два раза, пока не снизится до фонового уровня неокрашенных клеток. Таким образом, можно отследить до 8-ми делений клетки (рис. 3).

После измерения пролиферацию T-клеток памяти оценивать как процент неподелившихся ($CFSE^{high}$) и поделившихся ($CFSE^{low}$) $CD3^+CD45RO^+$ T-лимфоцитов. Результат регистрировать на 50000 событий в пробе.

1.10. Интерпретация данных

После регистрации пролиферации Т-клеток памяти определить коэффициент супрессии пролиферативного ответа k (%) по формуле:

$$k = 100 - \frac{P_{\text{Тп+МСК}} \times 100}{P_{\text{Тп}}},$$

где $P_{\text{Тп+МСК}}$ —пролиферация $\text{CD3}^+\text{CD45RO}^+$ Т-клеток памяти в ко-культуре МСК и МПК, стимулированной митогеном/аутоантигеном, %;

$P_{\text{Тп}}$ —пролиферация $\text{CD3}^+\text{CD45RO}^+$ Т-клеток памяти в культуре МПК, стимулированной митогеном/аутоантигеном, %.

Для разработки референтных интервалов был использован современный метод статистического анализа, основанный на вычислении 95% доверительного интервала коэффициента супрессии k на момент обследования пациентов с РС, нижняя граница которого представлена в табл. 2. Коэффициент супрессии k позволяет оценить способность аутологичных/аллогенных МСК 1 или 2-го пассажей супрессировать *in vitro* ФГА-/рМОГ₁₋₁₂₅-индуцированный пролиферативный ответ $\text{CD3}^+\text{CD45RO}^+$ Т-клеток памяти пациентов с РС.

Таблица 2

Референтные интервалы коэффициентов супрессии k (%)

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

При вычислении значения k определяется возможность использования исследуемых клеточных культур МСК для патогенетической терапии пациентов с РС:

1. МСК, k которых находится в пределах референтных интервалов, рекомендуются для трансплантации пациентам с РС в качестве патогенетической терапии.
2. МСК, k которых находится ниже референтных интервалов, не рекомендуются для трансплантации пациентам с РС в качестве патогенетической терапии.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Одной из причин ложноотрицательного результата в отношении жизнеспособности МПК может явиться использование токсичного для клеток флуоресцентного красителя CFSE при проведении лазерной проточной цитофлуориметрии. Вследствие этого реакцию окрашивания МПК необходимо останавливать строго через 5 мин. Временная погрешность в окрашивании приводит к увеличению количества погибших клеток. В некоторых случаях для предупреждения токсического действия CFSE, МПК можно окрашивать в полной культуральной среде RPMI-1640 с добавлением 1% ЭТС.
2. При нарушении асептических условий культуральных исследований может регистрироваться высокий уровень пролиферации Т-лимфоцитов в ответ на микробную контаминацию при культивировании клеток в среде RPMI-1640 без добавления антигенов. Чтобы избежать ложно-положительной пролиферации, все этапы методики необходимо выполнять в строго стерильных условиях с использованием стерильной посуды и реактивов.
3. Отсутствие пролиферации Т-клеток памяти в ответ на стимулятор может являться следствием иммуносупрессивного состояния организма

пациента с РС на фоне длительного лечения. В этом случае оценка иммуносупрессивных свойств МСК не является репрезентативной. Кроме того, следует учитывать, что оценка способности МСК ингибировать пролиферацию Т-клеток памяти пациентов с РС на фоне вторично-прогрессирующего течения также является нецелесообразной в связи с тем, что при данной форме доминируют нейродегенеративные изменения с минимальными проявлениями аутоиммунных реакций.

4. Учет результатов пролиферации клеток может выполняться также радиометрическим методом по инкорпорации ^3H -тимидина (при наличии разрешения по 2-му классу безопасности работы с изотопами) или спектрофотометрическим методом (МТТ-тест).