

Н. Н. Данилкович^{1,2}

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ НА ЭПИЛЕПТОГЕНЕЗ

*Научные руководители: канд. мед. наук, ст. преп. Л. Г. Шуст*¹,

*канд. мед. наук, доц. С. М. Космачева*²

Кафедра патологической физиологии,

¹*Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

²*РНИЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, г. Минск*

N. N. Danilkovich^{1,2}

IMMUNOLOGICAL FEATURES OF INFLUENCE OF CELL THERAPY ON EPILEPTOGENESIS

*Tutors: M. D. Ph., senior lecturer L. G. Shust*¹, *M. D. Ph. D S. M. Kosmacheva*²

Department of Pathological Physiology,

¹*Belarusian State Medical University, Minsk*

²*RSPC for Transfusion and Medical Biotechnology, Minsk*

Резюме. Терапия стволовыми клетками для неизлечимых расстройств центральной нервной системы давно рассматривается как перспективный терапевтический вариант. Мезенхимальные стволовые клетки обладают уникальными иммуномодулирующими свойствами и являются безопасным и перспективным кандидатом на клеточную терапию для резистентной эпилепсии.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, эпилепсия, клеточная терапия.

Resume. Stem cell therapy for incurable central nervous system disorders has long been viewed as a promising therapeutic option. Mesenchymal stem cells possess unique immunomodulatory properties and are a safe and promising candidate for cell therapy in resistant epilepsy.

Keywords: mesenchymal stem cells, epilepsy, cell therapy.

Актуальность. Эпилепсия относится к числу наиболее распространенных неврологических заболеваний. Патогенез эпилепсии характеризуется первичным локальным повреждением межнейронных связей головного мозга или генетически обусловленной нейродегенерацией. В последнее десятилетие активно разрабатываются методы клеточной терапии основных заболеваний человека с использованием мезенхимальных стволовых клеток (МСК) [1]. Терапевтический эффект МСК во много связан с их иммуносупрессорным потенциалом и варьирует в зависимости от источника происхождения клеток. Ингибиторные свойства МСК связаны также с их способностью подавлять секрецию цитокинов воспаления, участвующих в инициации эпилептических припадков. Используемые протоколы клеточной терапии предполагают введение достаточно высоких доз МСК (60 – 160 млн. клеток), что может оказывать влияние на состояние иммунного гомеостаза пациентов [2, 3].

Цель: изучить влияние клеточной терапии на патоиммунологические аспекты эпилепсии.

Задачи:

1. оценить состояние иммунной системы пациентов с симптоматической эпилепсией;

2. оценить влияние клеточной терапии с использованием аутологичных мезенхимальных стволовых клеток (АМСК) на состав иммунокомпетентных клеток в периферической крови пациентов с эпилепсией.

Материал и методы. В исследование включены 15 пациентов с симптоматической эпилепсией (СЭ), получавших стационарное лечение в Республиканском научно-практическом центре психического здоровья в 2016-2019 годах. Все пациенты имели средний возраст $38,2 \pm 3,4$, 2–35-летний срок заболевания (медиана – 19,6 года) и лекарственной устойчивостью к трем и более основным антиэпилептическим лекарственным средствам с последующим формированием фармакорезистентной СЭ. В качестве группы контроля выступали здоровые лица – доноры цельной крови РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий ($n=20$), сопоставимые по возрасту и полу с пациентами основной группы. Оценку популяционного состава лимфоцитов иммунокомпетентных клеток периферической крови проводили 15 пациентам до проведения клеточной терапии. Иммунологическое обследование проводили дважды – до и через 6-7 дней после проведения курса клеточной терапии. Клеточная терапия пациентам с СЭ проводили аутологичными МСК, полученными из костного мозга, на фоне приема пациентами антиэпилептических препаратов. МСК, выращенные *ex vivo*, вводили однократно внутривенно интактные МСК 1 млн/кг веса пациента и через 6-7 дней вводили дополнительно нейроиндуцированные МСК в количестве 5-10 млн. клеток.

Определение фенотипа иммунокомпетентных клеток периферической крови.

Образцы периферической крови здоровых лиц и пациентов с СЭ стабилизировали гепарином (20 ед/мл). Иммунокомпетентные клетки периферической крови оценивали количественно методом прямой иммунофлуоресценции на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II (Becton Dickinson, США), использовали программное обеспечение BD FACS Diva v7.0. Иммунокомпетентные клетки окрашивали моноклональными антителами (МКА), меченные флуорохромом. Состав лимфоцитов периферической крови определяли по их линейной принадлежности к Т-клеткам (CD3, CD4, CD8), В-клеткам (CD19) и естественным киллерным (ЕК) клеткам (CD56, CD57), а также другим значимым маркерам лимфоцитов (CD25, CD45RA, CD45RO, HLA-DR). В каждом образце анализировали не менее 50 000 клеток. Используемая панель флуоресцентно-меченых МКА для характеристики субпопуляций лимфоцитов периферической крови пациентов представлена в таблице 1.

Табл. 1. Панели моноклональных антител для выявления поверхностных маркеров лимфоцитов периферической крови у пациентов с эпилепсией

№ панели	Специфичность флуоресцентно-меченых моноклональных антител					
	FITC	PE	PE-Cy5	PE-Cy7	APC	APC-Cy7
1	CD3	CD57	CD45RA	CD4	CD56	CD8
2	CD4	CD38	CD3	CD25	HLA-DR	CD8
3	CD45RO	CD38	CD45RA	CD4	CD19	CD8
4	TCR $\gamma\delta$	CD3	CD19	CD4	CD95	CD8

Статистическая обработка данных. Количественные данные представлены в виде среднего значения (\bar{x}) и стандартного отклонения среднего значение (sd). Для

статистической обработки полученных данных использовали пакет программ Statistica 6.0. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. У пациентов с СЭ достоверно снижено содержание $CD3^+CD4^+$ Т-клеток хелперов (таблица 2). Уменьшение относительного количества Т-хелперов вызывало снижение значения иммунорегуляторного индекса (ИРИ, соотношение $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$ Т-клеток) ($p=0,071$). Также в периферической крови пациентов с СЭ наблюдалось снижение $TCR\gamma\delta$ клеток и наивных/покоящихся $CD3^+CD45RA^+$ Т-клеток.

Табл. 2. Содержание иммунокомпетентных клеток периферической крови у пациентов с СЭ и контрольной группы здоровых лиц

Популяция лимфоцитов	Содержание клеток (%) (x±sd)		Достоверность различия (P)
	Группа сравнения (здоровые лица), n=20	Основная группа (пациенты с СЭ), n=15	
$CD3^+ CD19^-$	69,67±6,82	68,50±7,99	0,590
$CD3^+ CD4^-$	48,14±7,01	38,56±7,46	<0,001
$CD3^+ CD8^-$	25,42±4,20	26,67±6,81	0,465
ИРИ*	1,89±0,33	1,65±0,52	0,071
$CD19^+ CD3^-$	8,89±2,89	9,42±3,23	0,552
$CD3^+ CD16^+ CD56^+$	6,38±3,92	12,6±8,45	0,003
$CD3^- CD16^+ CD56^+$	13,62±5,31	16,61±7,55	0,128
$CD3^+ CD57^+$	4,78±2,27	12,27±7,51	<0,001
$CD3^+ CD25^+$	7,76±3,55	9,93±10,29	0,369
$CD3^+ HLA-DR^+$	9,73±4,55	10,95±9,51	0,595
$TCR\gamma\delta^+$	5,89 ±2,27	4,12±1,78	0,003
$CD4^+ CD8^+$	1,11±0,59	2,14±1,90	0,023
$CD3^+ CD45RA^+$	40,18±8,70	24,73±10,76	<0,001

Одновременно у пациентов с СЭ было в 2 и 2,5 раз повышено содержание естественных киллерных Т-клеток $CD3^+CD16^+CD56^+$ и $CD3^+CD57^+$ соответственно. Экспрессия маркера $CD57$ строго коррелирует с содержанием таких цитотоксических протеинов как гранзим и перфорин.

Можно констатировать, что у пациентов с СЭ в периферической крови повышено содержание иммунокомпетентных клеток с цитотоксическими функциями и, соответственно, снижено содержание Т-хелперных клеток.

После проведения одного курса клеточной терапии у пациентов с СЭ приводило к повышению содержания Т-лимфоцитов ($CD3^+CD4^+$ Т-хелперов), и одновременно – к снижению количества цитотоксических Т-клеток ($CD3^+CD8^+$). За счет этого у пациентов повысилось значение ИРИ (таблица 3).

Нормализация субпопуляционного состава Т-лимфоцитов после клеточной терапии наблюдалась за счет снижения в 3 раза количества автивированных Т-клеток ($CD^+HLA-DR^+$), а также снижение в 1,75 раза количества Т-клеток, обладающих высокой цитолитической активностью ($CD3^+CD4^+CD57^+$).

Табл. 3. Характеристика субпопуляционного состава Т-лимфоцитов периферической крови пациентов с СЭ после проведения клеточной терапии АМСК

Популяция Т-клеток	Содержание клеток (%) (x±sd)		Достоверность различия (P)
	до введения АМСК, n=15	после введения АМСК, n=15	
CD3 ⁺	64,86±7,98	71,96±5,16	0,027
CD3 ⁺ CD4 ⁻	38,13±7,82	46,48±9,11	0,023
CD3 ⁺ CD8 ⁻	27,61±4,85	22,18±6,49	0,036
ИРИ	1,49±0,43	2,02±0,52	0,016
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	14,87±9,30	4,50±2,88	0,003
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD56 ⁺	8,78±3,37	4,81±3,09	0,010
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD57 ⁺	12,11±2,82	6,93±6,87	0,027
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD57 ⁺	1,87±2,26	4,26±1,51	0,010
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RA ⁺	15,72 ± 5,39	14,04 ± 6,41	0,512
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RO ⁺	24,38 ± 6,73	24,85 ± 7,90	0,882
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RA ⁺	21,85±7,45	11,84±5,18	0,020
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RO ⁺	12,67 ± 4,51	9,08± 4,15	0,068

Одновременно на фоне снижения количества активированных и цитолитических Т-клеток наблюдалось повышение содержания Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺CD57⁺), обладающих эффекторным потенциалом. Влияние МСК на естественные киллерные клетки характеризуется подавлением их пролиферации, экспрессии рецепторов и эффекторных функций путем секреции простагландинов.

Выводы:

1 В периферической крови пациентов с СЭ выявлено повышение содержания ЕК/ЕКТ клеток и снижение содержания CD3⁺CD4⁺ Т-клеток-хелперов, что указывает на участие иммунной системы организма пациента в прогрессировании заболевания.

2 Проведение курса клеточной терапии с использованием аутологичных МСК (интактных и нейроиндуцированных) пациентам с СЭ оказывает иммуномодулирующий эффект, вызывая субпопуляционные сдвиги в содержании Т-клеток, натуральных киллеров и клеток, обладающих киллерной активностью.

Литература

1. Опыт применения аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга в лечении пациентов с симптоматической эпилепсией / Ф.П. Хлебкозов, Т.В. Докукина, С.И. Игнатенко и др. // Эпилепсия и параксизмальные состояния. – 2014. – Т.6. - №1. – С. 6 - 14.
2. Shakhbazau, A. Autologous mesenchymal stromal cells as a therapeutic in ALS and epilepsy patients: treatment modalities and ex vivo neural differentiation / A. Shakhbazau, M. Potapnev // Cytotherapy. – 2016. – 8 (10). – P. 1245-1255.
3. Treatment of refractory epilepsy patients with autologous mesenchymal stem cells reduces seizure frequency: an open label study / F. Hlebokazov, T. Dakukina, S. Ihnatenko and et. al. // Advances in Medical Sciences. – 2017. – 62. – P. 273-279.