

УДК 616.853-085.015.6:616.419-018.4]-08

DOI: 10.14427/jipai.2019.1.34

Влияние клеточной терапии аутологичными мезенхимальными стволовыми клетками на содержание иммунокомпетентных клеток периферической крови пациентов с симптоматической эпилепсией

С.М. Космачева¹, Н.В. Гончарова¹, М.П. Потапнев¹, Л.А. Мороз¹, Ф.П. Хлебоказов², Т.В. Докукина²

¹ РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Беларусь;

² РНПЦ психического здоровья, Минск, Беларусь

Autologous mesenchymal stem cell-based cellular therapy impacts peripheral blood immunocompetent cells' content in patients with symptomatic epilepsy

S.M. Kosmacheva¹, N.V. Goncharova¹, M.P. Potapnev¹, L.A. Moroz¹, F.P. Hlebokazov², N.V. Dakukina²

¹ Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology&Medical BioTechnologies, Minsk, Belarus

² Republican Scientific and Practical Center for Mental Health, Minsk, Belarus

Аннотация

Методом проточной цитофлуориметрии оценили состояние клеточного иммунитета у 32 пациентов с СЭ на фоне приема антиэпилептических средств до введения МСК и у 12 пациентов после введения аутологичных МСК. Установлено, что у больных, по сравнению с контрольной группой здоровых лиц, в периферической крови повышено содержание CD3+CD16+CD56+ и CD3+CD57+ субпопуляций естественных киллерных Т клеток и снижено содержание CD3+CD4+ Т клеток-хелперов, TCRγδ+ клеток и наивных/покоящихся CD3+CD45RA+Т клеток. Введение пациентам с СЭ аутологичных МСК оказывало иммуномодулирующий эффект, вызывая повышение содержания CD3+CD4+Т клеток-хелперов, снижение количества CD3+CD8+(CD57+)цитотоксических Т клеток. Одновременно наблюдалось снижение в 3 раза количества активированных CD3+HLA-DR+Т клеток и в 1,75 раза - количества CD3+CD8+CD57+ Т клеток, содержания CD3+CD8+CD45RA+наивных Тклеток и в меньшей степени - CD3+CD8+CD45RO+Т клеток памяти в периферической крови. Сделан вывод о наличии прямого действия клеточной терапии на нормализацию показателей иммунного статуса пациентов с симптоматической эпилепсией, оказывающей благотворный терапевтический эффект у большинства пациентов.

Ключевые слова

Мезенхимальные стволовые клетки, симптоматическая эпилепсия, клеточный иммунитет, иммуномодуляция, клеточная терапия

Summary

Peripheral blood lymphocyte subsets in patients with symptomatic epilepsy (SE) were evaluated by flow cytometry before (n=32) and after (n=12) first course of cellular therapy using autologous mesenchymal stem cells (autoMSCs). It was shown that patients revealed higher content of CD3+CD16+CD56+ NKT cells and TcRγδ+ cells as well as lower content of CD3+CD4+ T cells when compared to healthy control subjects. After 6-7 days post starting of cellular therapy with autoMSCs in peripheral blood of patients with SE we detected increased up to normal content of CD3+CD4+ T cells, and decreased level of CD3+HLA-DR+ activated T cells, CD3+CD8+CD57+ cytotoxic T cells, CD3+CD8+CD45RA naïve T cells. We concluded that MSCs-based cellular therapy of patients with SE possessed direct immunomodulation upon impaired T cell subsets' content in peripheral blood prior to beneficial clinical effect.

Keywords

Mesenchymal stem cells, symptomatic epilepsy, cells immunity, immunomodulation, cellular therapy.

Эпилепсия – распространенное психоневрологическое заболевание, имеющее хронический латентный характер течения и проявляющееся периодическими судорожными припадками. Эпилепсия является полиэтиологическим заболеванием с выраженным иммуновоспалительным механизмом генерации эпилептических припадков [1]. Поэтому, наряду со стандартными антиэпилептическими лекарственными средствами, в лечении эпилепсии применяют стероидные гормоны, препараты нормального иммуноглобулина, тималин, Т-активин, тимоген, тимоптин, циклоферон, полиоксидоний, являющиеся иммунокорректирующими препаратами [2, 3]. Иммунотерапевтические средства в сочетании с антиэпилептическими препаратами приводят к положительному клиническому результату [3, 4]. В настоящее время новым направлением в биотерапии эпилепсии рассматривается применение стволовых клеток, которые обладают нейрорегенеративными и иммуноподавляющими характеристиками [5, 6]. Среди стволовых клеток наиболее часто применяют мезенхимальные стволовые (стромальные) клетки (МСК), которые оказывают толерогенное и противовоспалительное действие [7, 8]. Терапевтический эффект МСК во многом связан с их иммуносупрессорным потенциалом и варьирует в зависимости от источника происхождения МСК [9]. Ингибиторные свойства МСК связаны также с их способностью подавлять секрецию цитокинов воспаления, участвующих в инициации эпилептических припадков [1, 4, 10]. Используемые протоколы клеточной терапии предполагают введение достаточно высоких доз МСК (60-160 млн. клеток), что может оказывать влияние на состояние иммунного гомеостаза пациентов [11].

Цель настоящего исследования – оценить степень воздействия клеточной терапии с применением аутологичных МСК на популяционный состав лимфоцитов периферической крови у пациентов с симптоматической эпилепсией.

Методы

В исследование включены 32 пациента с симптоматической эпилепсией (СЭ), получавших стационарное лечение в Республиканском научно-практическом центре психического здоровья в 2011- 2018 годах. Все пациенты имели 2-35-летний срок заболевания (медиана – 19,6 года), неоднократно госпитализировались для лечения, что привело к развитию лекарственной устойчивости к трем и более основным антиэпилептическим лекарственным средствам и формированию

фармакорезистентной СЭ. Исследования проводились с одобрения Этического комитета РНПЦ психического здоровья (заседание от 11.04.2011 г.). Среди пациентов основной группы было 15 мужчин и 17- женщин в возрасте от 20 до 54 лет. 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 32 пациентам до проведения клеточной терапии. У 12 пациентов 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 (в среднем – 1 млн/кг веса) и через 6-7 дней вводили дополнительно нейроиндуцированные МСК в количестве 5-10 млн. клеток [11].

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. Использовали проточный цитофлуориметр BD FACSCantoII (Becton Dickinson, США) с программным обеспечением BD FACSDiva v7.0. Иммунокомпетентные клетки оценивали с помощью моноклональных антител (МКА), меченных 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. Использованная панель флуоресцентно-меченых МКА для характеристики субпопуляций лимфоцитов периферической крови пациентов представлена в таблице 1.

Статистическая обработка данных. Данные представлены в виде средних и стандартных отклонений среднего, для их обработки использовали программный пакет Statistica 6,0. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Таблица 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	CD45R0	CD38	CD45RA	CD4	CD19	CD8
4	TCR $\gamma\delta$	CD3	CD19	CD4	CD95	CD8

Результаты и обсуждение

К настоящему времени имеется достаточно наблюдений, свидетельствующих об участии иммунных механизмов в прогрессии эпилепсии [1, 2, 4]. При этом задействованными считают как аутоантитела к антигенам нервной системы, так и лимфоциты, представленные в периферической крови и мигрирующие в центральную нервную систему.

Проведенное нами изучение клеточного иммунитета пациентов с СЭ до проведения клеточной терапии выявило ряд нарушений популяционного состава иммунокомпетентных клеток в периферической крови. Как представлено в табл. 2, у пациентов с СЭ значимо снижено содержание CD3+CD4+ Т-клеток-хелперов, что отмечают и другие авторы [4]. Уменьшение относительного количества Т-хелперов обусловило тенденцию к снижению значения иммунорегуляторного индекса (ИРИ, соотношения CD3+CD4+/CD3+CD4+Т-клеток) ($p=0,071$). Также в периферической крови пациентов с СЭ наблюдалось снижение содержания TCR $\gamma\delta$ + клеток и наивных/покоящихся CD3+CD45RA+Т-клеток.

Одновременно у пациентов с СЭ было значительно (в 2 и более раз) повышено содержание CD3+CD16+CD56+ и CD3+CD57+ естественных киллерных Т-клеток, но не CD3-CD16+CD56+ естественных киллерных (ЕК) клеток. Как известно, экспрессия CD57 характерна для слабо пролиферирующих Т и ЕК-клеток с высокой цитолитической активностью, в большей степени обнаруживается на клетках, находящихся на поздних стадиях дифференцировки при хронических воспалительных процессах [12, 13]. Повышенная экспрессия молекулы CD57 характерна для клеток, находящихся вне кровеносного русла и лимфоузлов, расположенных в тканях, с увеличенной продолжительностью жизни. Также повысилось по сравнению со здоровыми лицами содержание в периферической крови пациентов с СЭ незрелых двойных позитивных CD3+CD4+CD8+ Т-клеток. С учетом отсутствия у пациентов с

СЭ изменения общего содержания лейкоцитов периферической крови данные относительного содержания субпопуляций иммунокомпетентных клеток следует признать репрезентативными для данной группы пациентов и сопоставимыми с группой здоровых лиц.

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

Определив исходный иммунный статус пациентов с СЭ, мы оценили изменения субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток периферической крови после проведения курса клеточной терапии. Результаты представлены в табл. 3.

Проведение одного курса клеточной терапии у пациентов с СЭ приводило к некоторому повышению содержания Т-лимфоцитов, в том числе CD3+CD4+Т-клеток-хелперов, и одновременно - к снижению количества CD3+CD8+цитотоксических Т-клеток. За счет этого у пациентов с СЭ после проведения одного цикла клеточной терапии значимо повысилось значение иммунорегуляторного индекса. Еще одним признаком нормализации субпопуляционного состава Т-лимфоцитов при проведении клеточной терапии явилось снижение в 3 раза количества активированных CD3+HLA-DR+Т-клеток, а также снижение в 1,75 раза количества CD3+CD8+CD57+ Т-клеток, обладающих высокой цитолитической активностью [13]. Одновременно на фоне снижения количества активированных и цитолитических Т-клеток наблюдалось повышение содержания клеток с фенотипом CD3+CD4+CD57+ Т-клеток - хелперов, обладающих эффекторным потенциалом. Проведение курса клеточной терапии с использованием МСК мало повлияло на баланс наивных/покоящихся и ранее активированных клеток памяти среди CD3+CD4+ Т-хелперов периферической крови, но резко снизило среди

Таблица 2. Содержание иммунокомпетентных клеток периферической крови у пациентов с симптоматической эпилепсией и у 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=32	
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
TCRγδ+	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

Примечание: *ИРИ—иммунорегуляторный индекс (отношение CD3+CD4+/CD3+CD8+ клеток)

Таблица 3. Характеристика субпопуляционного состава Т лимфоцитов периферической крови пациентов с симптоматической эпилепсией при проведении клеточной терапии с использованием аутологичных мезенхимальных стволовых клеток

Популяция Т-клеток	Содержание клеток (%x ±sd)		P
	до введения МСК, n=12	после введения МСК, n=12	
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

цитотоксических CD8+Т клеток содержание CD3+CD8+CD45RA+наивных клеток и, в меньшей степени, - CD3+CD8+CD45RO+Т клеток памяти. Влияние МСК на ЕК клетки, как известно, характеризуется подавлением их пролиферации и эффекторные функции (цитотоксичность, продукция цитокинов)[4]. Результаты изменения субпопуляций ЕК клеток в периферической крови пациентов с СЭ после проведения цикла клеточной терапии в наших исследованиях представлены в таблице 4.

Как видно из таблицы, у пациентов с СЭ после проведения цикла клеточной терапии наблюда-

лось снижение содержания CD3-CD57+и CD3-CD56+CD57+субпопуляций цитотоксических ЕК клеток в периферической крови на фоне сохранения исходного уровня CD3-CD16+CD56+ЕК клеток. Количество CD3+CD16+CD56+естественных киллерныхТ клеток практически не изменилось после проведения курса клеточной терапии.

Таким образом, проведение пациентам с фармакорезистентной СЭ клеточной терапии с использованием аутологичных МСК уже на ранних стадиях оказывало иммуномодулирующий эффект, вызывая субпопуляционные сдвиги в содержании Т клеток и ЕК/ЕКТ клеток пери-

Таблица 4. Влияние клеточной терапии на содержание в периферической крови пациентов с симптоматической эпилепсией естественных киллерных клеток и естественных киллерных Тклеток

Субпопуляция клеток	Содержание клеток (% , x +sd)		
	до введения МСК, n=12	после введения МСК, n=12	P
CD3-CD16+CD56+	21,42±8,01	19,22±7,15	0,509
CD3-CD57+	12,28±5,15	7,04±5,15	0,028
CD3-CD56+CD57+	2,49±2,65	6,70±4,37	0,011
CD3+CD16+CD56+	13,42±10,7	9,71±3,39	0,306

ферической крови. Эти изменения связаны с нормализацией состава и баланса иммунокомпетентных клеток, на фоне которых реализуется терапевтический эффект МСК.

Заключение

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 прогрессии заболевания. Проведение клеточной терапии с использованием аутологичных МСК оказывало

иммуномодулирующее действие на субпопуляционный состав иммунокомпетентных клеток периферической крови на ранних этапах после проведения терапии. Нормализация показателей иммунного статуса по показателям периферической крови предшествовало положительному клиническому улучшению у большинства пациентов с СЭ.

Работа выполнена при поддержке Министерства здравоохранения Республики Беларусь (НИР № госрегистрации 20174166).

Конфликт интересов, связанных с опубликованием статьи, у авторов отсутствует.

Литература

1. Vezzani A., Lang B., Aronica E. Immunity and inflammation in epilepsy. *Cold Spring Harbor Perspect Med.* 2016; 6: a022699. doi: [10.1007/s00401-015-1481-5](http://dx.doi.org/10.1007/s00401-015-1481-5).
2. Калинин В.В., Субботин К.Ю., Ермакова Н.Г. Нейроиммунологические отношения при парциальной эпилепсии. Взаимодействие клинических, нейробиологических и иммунных факторов. Роль клеточного иммунитета. *Социальная и клиническая психиатрия* 2017; Т. 27, №2: 9-16.
3. Липатова Л.В. Нейроиммунные механизмы эпилепсии как ключ к патогенетическому лечению заболевания. Эпилепсия и пароксизмальные состояния 2010; Том 2, №3: 20-27.
4. Кузнецова Л.В., Ветрилл Л.А., Карпова М.Н. Нейроиммунологические аспекты патогенеза эпилепсии. *Успехи физиол. наук* 2014; 45 (3): 32-22.
5. Roper S.N., Steindler D.A. Stem cells as potential therapy for epilepsy. *Exp. Neurol.* 2013; 244: 59-66. Doi: [10.1016/j.expneurol.2012.01.004](http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.01.004).
6. Shakhbazov A., Potapnev M. Autologous mesenchymal stem cells as a therapeutic in ALS and epilepsy patients: treatment modalities and ex vivo neural differentiation. *Cytotherapy* 2016; 18 (10): 1245-1255. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.06.001>.
7. Маянская И.В., Гоганова А.Ю., Толкачева Н.И. и др. Иммуносупрессивное действие мезенхимальных стволовых (стромальных) клеток. *Иммунология* 2013; №2: 22-128.
8. Bowles A.C., Wise R.A., Gerstein B.Y. et al. Immunomodulatory effects of adipose stromal vascular fraction cells promote alternative activation macrophages to repair tissue damage. *Stem Cells* 2017; vol. 35 (10): 2198-2207. <http://dx.doi.org/10.1002/stem.2689>.
9. Климович В.Б. Иммуномодулирующая активность мезенхимальных стромальных (стволовых) клеток. *Медицинская иммунология* 2014; Т. 16, №2: 107-126.
10. Gao F., Chiu S.M., Motan D.A.L. et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death and Disease* 2016; 7, e2062. doi: [10.1038/cddis.2015.327](http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2015.327).
11. Hlebokazov F.P., Dakukina T.V., Ighnatenko S.I. et al. First experience in mesenchymal stem cell-based cellular therapy of patients with drug-resistant symptomatic epilepsy in Belarus. *Advances in Medical Sciences* 2017; v.62 (2): 273-279. <http://dx.doi.org/10.1016/j.advms.2016.12.004>.
12. Kared H., Martelli S., Ng T.P., Pender S.L.F., Larbi A. CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes. *Cancer Immunol. Immunother.* 2016; 65: 441-452. Doi [10.1007/s00262-016-1803-z](http://dx.doi.org/10.1007/s00262-016-1803-z).
13. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Васильева Е.В. и соавт. Фенотипическая характеристика цитотоксических Т-лимфоцитов: регуляторные и эффекторные молекулы. *Медицинская иммунология* 2018; 20 (2): 227-240. Doi: [10.15789/1563-0625-2018-2-227-240](http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2018-2-227-240).

Сведения об авторах:

Космачева Светлана Михайловна – кандидат медицинских наук, доцент, зав. лабораторией биологии и генетики стволовых клеток РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий 220053, Минск, Долгиновский тракт, 160, тел. 289 86 20, моб. +375 (29)577 03 36. e-mail: 4kosmacheva@mail.ru
 Гончарова Наталья Васильевна – старший научный сотрудник лаборатории биологии и генетики стволовых клеток РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий. 220053, Минск, Долгиновский тракт, 160, тел. 289 86 20, моб. +375 (29)255 17 79. e-mail: ksiu2006@gmail.com.
 Потапнев Михаил Петрович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом клеточных биотехнологий РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий. Адрес: 220053, Беларусь, Минск, Долгиновский тракт, д.160 Телефон: 8 (017) 289-86-20, моб. +375 (29) 638 02 71 e-mail: mpotapnev@yandex.by

Поступила 12.02.2019 г.