Проблемная комиссия «Эпилепсия. Пароксизмальные состояния» РАН
и Министерства здравоохранения Российской Федерации

Российская Противоэпилептическая Лига

ЭПИЛЕПСИЯ и пароксизмальные состояния

2018 Том 10 №1

EPILEPSY AND PAROXYZMAL CONDITIONS

ISSN 2077-8333

2018 Vol. 10 №1

www.epilepsia.su

Включен в перечень ведущих
рецензируемых журналов и изданий ВАК

© Коллектив авторов, 2018
ISSN 2077-8333
DOI: 10.17749/2077-8333.2018.10.1.035-051

Клеточная терапия эпилепсии. Клинико-иммуннологические аспекты

Докукина Т.В.[1], Потапнев М.П.[3], Космачева С.М.[2], Хлебоказов Ф.П.[1], Слобина Е.Л.[4], Голубева Т.С.[1], Мисюк Н.Н.[1], Махров М.В.[1], Шамрук И.В.[1], Королевич П.П.[1], Мартыненко А.И.[1], Быченко И.В.[1], Будько Т.О.[1]

[1] Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр психического здоровья» (Долгиновский тракт, 152, Минск 220053, Республика Беларусь)

[2] Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» (Долгиновский тракт, 160, Минск 220053, Республика Беларусь)

[3] Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, Минск 220116, Республика Беларусь)

[4] Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр рентгенрадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ул. Профсоюзная, 86, ГСП-7, Москва 117997, Россия)

Резюме

Цель – разработать и внедрить метод лечения фармакорезистентной эпилепсии с использованием аутологичных мезенхимальных стволовых клеток на основе определения новых нейровизуализационных, иммунологических и нейрофизиологических предикторов функционального состояния головного мозга. Материалы и методы. Объект исследования – пациенты с симптоматической фармакорезистентной эпилепсией, МСК костного мозга. Методы исследования: культуральный, морфологический, иммунологический, молекулярно-генетический, клинико-функциональный, лабораторный, патопсихологический, нейрофизиологический. Под наблюдением находились 20 пациентов (12 мужчин и восемь женщин) с фармакорезистентной симптоматической эпилепсией в возрасте 23-46 лет, длительность болезни 7-29 лет. Для оценки результатов использовались стандартные параметрические и непараметрические методы статистики. Результаты. Получены культуры аутологичных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) для проведения 20 курсов клеточной терапии. Проведено 40 трансплантаций аутологичных МСК костного мозга (20 внутривенных и 20 эндолюмбальных). Клеточность трансплантата для внутривенного введения составила 39,5-110,0 млн, для эндолюмбального введения – 5,1-10,0 млн с жизнеспособностью не менее 95%. Распределение МСК по экспрессии ключевых поверхностных маркеров (CD105+, CD90+, CD45$^-$, CD34) соответствовало критериям Международной ассоциации по клеточной терапии (ISCT). Побочных реакций и осложнений на введение АМСК не наблюдалось. В большинстве образцов нейродифференцированных МСК установлено достоверное повышение экспрессии нейро-специфической енолазы, нестина и МАР-2У пациентов с симптоматической эпилепсией наиболее существенные сдвиги выявлены в уровнях цитотоксических и активированных клеток, а также натуральных киллеров и Т-клеток с киллерной активностью. После проведения курса клеточной терапии отмечается достоверное снижение CD4+CD8+, CD3+CD8+, CD3+CD95+, CD8+CD25+ клеток. Снижается также содержание натуральных киллеров и Т-клеток с киллерной активностью, однако их уровень остается достоверно высоким по сравнению с показателями группы сравнения. Изучено состояние пациентов, прошедших лечение аутологичными МСК через 3-6-12 мес. после их введения и пациентов группы сравнения. Заключение. Первый опыт проведения клеточной терапии пациентам с эпилепсией в Республике Беларусь показал, что внутривенное введение аутологичных МСК и эндолюмбальное введение нейроиндуцированных аутологичных МСК может быть эффективной дополнительной терапией выбора у пациентов с фармакорезистентной формой заболевания.

Ключевые слова
Симптоматическая эпилепсия, резистентные приступы, мезенхимальные стволовые клетки, трансплантация, нейроиндукция, электроэнцефалограмма, нейровизуализация.

Статья поступила: 11.12.2017 г.; **в доработанном виде:** 29.01.2018 г.; **принята к печати:** 12.03.2018 г.

Конфликт интересов
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в отношении данной публикации.

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Для цитирования
Докукина Т.В., Потапнев М.П., Космачева С.М., Хлебоказов Ф.П., Слобина Е.Л., Голубева Т.С., Мисюк Н.Н., Махров М.В., Шамрук И.В., Королевич П.П., Мартыненко А.И., Быченко И.В., Будько Т.О. Клеточная терапия эпилепсии. Клинико-иммуннологические аспекты. *Эпилепсия и пароксизмальные состояния*. 2018; 10 (1): 35-51. DOI: 10.17749/2077-8333.2018.10.1.035-051.

Cell therapy of epilepsia. Clinical and immunological aspects

Dokukina T.V.[1], Potapnev M.P.[3], Kosmacheva S.M.[2], Hlebokazov F.P.[1], Slobina E.L.[4], Golubeva T.S.[1], Misjuk N.N.[1], Mahrov M.V.[1], Shamruk I.V.[1], Korolevich P.P.[1], Martynenko A.I.[1], Bychenko I.V.[1], Bud'ko T.O.[1]

[1] Republican Scientific and Practical Center of Mental Health (152 Dolginovsky tract, Minsk 220053, Republic of Belarus)

[2] Republican Scientific and Practical Center of Transfusiology and Medical Biotechnologies (160 Dolginovsky tract, Minsk 220053, Republic of Belarus)

[3] Belarusian State Medical University (83 prospekt Dzerzhinskogo, Minsk 220116, Republic of Belarus)

[4] Russian Scientific Center of X-ray Radiology of the Ministry of Health of the Russian Federation (86 Profsoyuznaya ul., GSP-7, Moscow 117997, Russia)

Summary
The aim is to develop and implement a method for the treatment of drug-resistant epilepsy using autologous mesenchymal stem cells and the neuroimaging, immunological and neurophysiological predictors of the brain function. Material and Methods. Twenty patients (12 males and 8 females) with symptomatic drug-resistant epilepsy participated in the study. The patient age varied from 23 to 46 years; and the duration of epilepsy was 7-29 years. Autologous mesenchymal stem cells of the bone marrow were characterized using cultural, morphological, immunological, molecular-genetic, clinical-functional, laboratory, pathopsychological, and neurophysiological methods. The standard parametric and nonparametric statistical tests were used to evaluate the results. Results. The study resulted in producing of cultured autologous mesenchymal stem cells of the bone marrow (AMSCBM) sufficient to conduct 20 courses of cell therapy. In total, 40 transplantation procedures using AMSCBM were performed (20 intravenous and 20 endolumbar injections). Cellularity index in the intravenous inoculate ranged from 39.5 to 110.0 million and that for the endolumbar injection – from 5.1 to 10.0 million with viability not less than 95%. The distribution of AMSCBM by key surface markers (CD105+, CD90+, CD45-, CD34-) matched the criteria of the International Association for cell therapy (ISCT). The cell injections were well tolerated and did not cause any severe adverse effects. To monitor the process of neurogenic differentiation, the expression of the surface markers was determined. In most samples with confirmed neural differentiation, a significant increase in the expression of neuron-specific enolase, nestin and MAR-2 was detected. In patients with symptomatic epilepsy, the most significant deviations from normal values were found for the numbers of cytotoxic and activated cells, natural killer (NK) cells, and T-cells with the NK activity. After a course of cell therapy, a significant decrease in CD4+CD8+, CD3+CD8+, CD3+CD95+, and CD8+CD25+ cells was noted. Also decreased were the numbers of NK cells and T-cells with the NK activity, however, their levels remained relatively high as compared with the control group. Following the treatment, we continued to monitor the patients for 3, 6, and 12 months after the cell administration as well as the patients from the group of comparison. Conclusion. For the first time in the Republic of Belarus, cell therapy in patients with epilepsy was conducted. An intravenous injection of AMSCBM and endolumbar administration of neuro-induced AMSCBM can serve an effective additional therapy of choice in patients with drug-resistant epilepsy.

Key words
Symptomatic epilepsy, resistant seizures, mesenchymal stem cells, transplantation, neuro-induction, electroencephalogram, neuroimaging.

Received: 11.12.2017; **in the revised form:** 29.01.2018; **accepted:** 12.03.2018.

Conflict of interests
The authors declare about the absence of conflict of interest with respect to this publication.

All authors contributed equally to this article.

For citation
Dokukina T. V., Potapnev M. P., Kosmacheva S. M., Hlebokazov F. P., Slobina E. L., Golubeva T. S., Misjuk N. N., Mahrov M. V., Shamruk I. V., Korolevich P. P., Martynenko A. I., Bychenko I. V., Bud'ko T. O. Cell-therapy of epilepsia. Clinical and immunological aspects. Epilepsy and paroxysmal conditions. [*Epilepsiya i paroksizmal'nye sostoyaniya*]. 2018; 10 (1): 35-51 (in Russian). DOI: 10.17749/2077-8333.2018.10.1.035-051.

Corresponding author
Address: 152 Dolginovskii trakt, Minsk 220053, Belarus.
E-mail address: Michele2001@mail.ru (Makhrov M. V.)

Введение

Эпилепсия – это психоневрологическое заболевание, которое характеризуется наличием двух или более неспровоцированных повторяющихся эпилептических приступов, обусловленных аномальной электрической деятельностью участка коры головного мозга. Не менее 60 млн человек страдают от эпилепсии во всем мире [1-4].

XXI век – время терапии неинфекционных заболеваний. Из доклада ВОЗ [5] следует, что к 2020 г. хронические заболевания, ограничивающие функции органов и тканей с неблагоприятным прогнозом, будут причиной 70% случаев смерти человека. Поэтому возникает потребность в развитии регенеративной медицины, занимающейся восстановлением органов и тканей, предлагающей новые решения для длительного поддержания качества жизни и снижения социальных последствий хронических заболеваний [6,7].

Современные методы лечения эпилепсии включают применение противоэпилептических и психотропных лекарственных средств, аппаратные методики (транскраниальная магнитная стимуляция, транскраниальная микрополяризация, стимуляция блуждающего нерва, биологическая обратная связь и др.), а также в ряде случаев – хирургическое лечение [8-10]. Противоэпилептические лекарственные средства снижают возбудимость нейронов эпилептического очага, стабилизируют мембранные потенциалы этих клеток, что приводит к уменьшению количества спонтанных разрядов и, соответственно, к снижению количества приступов [11-13]. Хирургия направлена на удаление патологически функционирующих участков коры больших полушарий головного мозга, которые являются источником аномальных электрических импульсов, приводящих к судорогам [10,14]. Данные методы лечения воздействуют на неврологический аспект эпилепсии, но не могут напрямую воздействовать на нейропсихиатрические компоненты. Перспективным новым методом лечения эпилепсии является использование стволовых клеток для лечения как биологических, так и психиатрических компонентов [15].

Известно о терапевтическом использовании стволовых клеток на нескольких моделях неврологических заболеваний, таких как рассеянный склероз, инсульт и болезнь Паркинсона [16]. Трансплантационная терапия стволовыми клетками все больше рассматривается как возможный вариант лечения при эпилепсии [17]. Доклинические и клинические исследования этого подхода использовали несколько типов клеток, включая клетки-предшественники гиппокампа, нервные стволовые клетки (НСК), ГАМКергические клетки-предшественники и системное введение мононуклеарных клеток костного мозга и мезенхимальных клеток [17]. Хотя в каждом типе клеток используется разный механизм действия, все они стремятся уменьшить возбудимость нейронов в эпилептической области ткани головного мозга.

Считается, что трансплантация НСК использует многогранный подход, создавая новые ГАМКергические интернейроны, а также новые астроциты [17]. Основополагающим значением новых астроцитов является экспрессия глиального производного нейротрофического фактора (GDNF), который обладает противосудорожными свойствами [18]. Имеются очевидные терапевтические эффекты трансплантации НСК, включая снижение частоты и продолжительности приступов, несмотря на то, что в когнитивной функции изменений не происходит [18]. Потеря ГАМКергических нейронов приводит к отсутствию подавляющего контроля над эпилептической зоной мозга [17]. Таким образом, ГАМКергическая клеточная терапия фокусируется на замене потери ГАМКергических нейронов, тем самым увеличивая тормозящий синаптический контроль пораженной области [17].

Результаты применения МСК на экспериментальных моделях эпилепсии на животных являются обнадеживающими. На сегодняшний день различные типы стволовых клеток, включая нервные стволовые клетки, МСК, эмбриональные и фетальные стволовые клетки/клетки-предшественники, были использованы на животных моделях эпилепсии [19-23]. МСК из костного мозга (интактные или генетически модифицированные) вводили эпилептическим крысам внутривенно, интравентрикулярно, интраперитонеально или непосредственно в гиппокамп, что обычно приводило к уменьшению количества судорог и лучшей сохранности нейронов [19,20,24-30].

Пилокарпин-индуцированная эпилепсия, широко используемая в модели на грызунах, оказалась очень чувствительной к МСК-терапии. Клетки, мечен-

ные бромдезоксиуридином и локализованные в гиппокампе после внутривенного введения, значительно сократили количество приступов, в то время как плотность нейронов увеличилась [31]. Трансплантация аутологичных МСК также улучшила несбалансированную экспрессию аденозиновых рецепторов и параметров электроэнцефалограммы в модели эпилепсии [25]. Положительные механизмы действия МСК при эпилепсии, включая микровезикулы и паракринные факторы, недавно были широко рассмотрены Agadi и Shetty [30]. Эта исследовательская группа показала, что несмотря на то, что при внутривенном введении EGFP + МСК не попадали в поврежденный гиппокамп, они получали (через растворимые факторы) в значительной степени нейропротекцию, включая снижение потери ГАМКергических интернейронов, снижение концентрации миелопероксидазы и активацию экспрессии генов, кодирующих противоспалительные цитокины в гиппокампе [30]. Другой механизм влияния МСК на ЦНС может осуществляться через ингибирование рецептора N-метил-D-аспартата (NMDAR) субъединицы и индуцированние глутаматом кальциевых потоков с помощью растворимых факторов МСК [32].

Вариант замещения клеток, тем не менее, считается перспективным при лечении эпилепсии [20,33,34]. ГАМКергическая нейронная дифференциация *in situ* действительно имела место для плюрипотентных стволовых клеток человека [34] или эмбриональных нервных стволовых клеток/клеток-предшественников [35]. Имплантация специализированных МСК с подавлением экспрессии гена Hes1 улучшала функциональное восстановление эпилептических крыс, и, что важно, ГАМКергическая трансдифференцировка трансплантированных клеток коррелировала с функциональным восстановлением [20]. Li с соавт. продемонстрировали сокращение хронических судорог в мышиной модели CA3-селективного эпилептогенеза после трансплантации гиппокампальных человеческих МСК, генетически модифицированных для высвобождения аденозина [36].

В другом недавнем исследовании трансплантация МСК человека в модели пилокарпин-индуцированной эпилепсии грызуна также привела к значительному снижению ключевых параметров, таких как частота и продолжительность судорог, отек мозга и потеря пирамидальных и ГАМКергических нейронов [19,29]. В общей сложности 2×10^5 клеток стереотаксически вводили в билатеральный дорсальный гиппокамп (8×10^5 МСК человека/кг веса животных) без использования каких либо иммунодепрессантов. Показано, что трансплантированные человеческие МСК (в основном вокруг места инъекции), остающиеся недифференцированными в ЦНС крысы, продуцируют нейропротекторные и противовоспалительные цитокины, такие как FGF-6, глюкокортикоид-индуцированный рецептор фактора некроза опухоли (GITR), MIP-3β, амфирегулин и остеопротегерин [19].

Интересно и важно, что человеческие МСК предоставляют различные цитокины в зависимости от текущего патофизиологического микроокружения: при имплантации в перерезанный спинной мозг факторами, которые они высвобождали, были bFGF, нейротрофин-3 (NT-3), нейтрофил-активирующий пептид 2 (NAP-2), GITR и VEGF-R3 [19,37].

Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSCs) являются стволовыми клетками, полученными из взрослых клеток, которые обладают преимуществом при аутологичной трансплантации [38]. Одной из целей применения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток является генерация популяции нервных клеток, которые выделяют специфические нейротрансмиттеры (например, гамма-аминомасляную кислоту – ГАМК) и интегрируют их в конкретное место, такое как зубчатая извилина [39]. Такое целенаправленное введение нейротрансмиттер-продуцирующих нервных клеток может послужить мощной аутологичной терапией для эпилепсии в будущем.

Понимание механизма действия клеточной терапии требует мечения клеток для оценки их выживаемости *in situ* с использованием трансгенных (чаще всего GFP) или других флуоресцентных меток [27,30,40]. Группа Da Costa показала, что имплантация мононуклеарных клеток костного мозга защищает экспериментальных крыс от развития спонтанных рецидивов судорог и сохраняет плотность нейронов гиппокампа. Несмотря на то, что донорские GFP + мононуклеарные клетки костного мозга редко встречались в мозге реципиентных эпилептических крыс, длительное наблюдение (120 дней после трансплантации) также показало снижение частоты возникновения и более низкой продолжительности судорог [27]. МСК костного мозга, введенные внутривенно, уменьшали уровни провоспалительных цитокинов TNFα, IL-1β и IL-6, тогда как уровень противоспалительного цитокина IL-10 увеличивался. Трансплантаты, сделанные в начале пилокарпин-индуцированного припадка, предотвратили глиоз и потерю нейронов и стимулировали пролиферацию нейронов [28].

Терапия стволовыми клетками представляет собой многообещающий альтернативный подход к лечению эпилепсии, который принципиально отличается от противосудорожных лекарственных средств и электростимуляции, направленных на устранение симптомов, а не на устранение основных причин эпилепсии. Терапия стволовыми клетками способна обеспечить нейротрофическими факторами и стимулировать нейрогенез. Установление последовательного метода контролируемой дифференцировки стволовых клеток в нужные клетки делает возможным лечение эпилепсии замещением дефицитных или дефектных нейронов с использованием собственных стволовых клеток пациента. В то же время способность трансплантированных стволовых клеток

к дифференцировке должна быть сбалансирована с учетом опасности возникновения опухолевого процесса. Неконтролируемая дифференциация и миграция стволовых клеток могут представлять серьезный риск для роста опухоли и метастазирования. Исследования продолжительности жизни стволовых клеток и их долгосрочного продуцирования трофических факторов помогут оценить безопасность и эффективность терапии стволовыми клетками для лечения фармакорезистентной эпилепсии, которая чаще всего является неврологическим заболеванием на протяжении всей жизни [41].

Во всех странах мира и в Республике Беларусь (РБ) существует обязательное государственное регулирование клеточной терапии.

В Республике Беларусь регулирующими документами являются: Закон «О здравоохранении» Республики Беларусь. Статья 18-3 введена Законом № 164-З от 16.06.2014 г. «Оказание медицинской помощи пациентам с использованием биомедицинских клеточных продуктов». Биомедицинские клеточные продукты – пересадочный материал, полученный на основе клеток человека, за исключением эмбриональных, фетальных и гемопоэтических стволовых клеток, генетически модифицированных клеток человека. Технический кодекс установившейся практики ТКП 556-2014 «Медицинские продукты на основе клеток человека» утвержден Департаментом фармацевтической промышленности Минздрава Республики Беларусь (МЗ РБ) от 20.12.2014 г. № 84.

Государственное регулирование клеточной терапии в Российской Федерации: Федеральный Закон от 23.06.16 г. № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах». Статья 2. Биомедицинский клеточный продукт – комплекс, состоящий из клеточной линии (клеточных линий) и вспомогательных веществ либо из клеточной линии (клеточных линий) и вспомогательных веществ в сочетании с прошедшими государственную регистрацию лекарственными средствами для медицинского применения и (или) медицинскими изделиями. Клеточная линия – стандартизованная популяция клеток одного типа с воспроизводимым клеточным составом, полученная путем изъятия из организма человека биологического материала с последующим культивированием клеток вне организма человека. Вспомогательные вещества – вещества неорганического или органического происхождения, используемые при разработке и производстве биомедицинского клеточного продукта.

С 2012 г. на клинической базе Республиканского научно-практического центра психического здоровья (Минск) проводится научно-исследовательская работа по разработке и внедрению в практическую деятельность методики трансплантации аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, индуцированных в нейрогенном направлении, для лечения симптоматической фармакорезистентной эпилепсии.

Цель исследования – разработать и внедрить метод лечения фармакорезистентной эпилепсии с использованием аутологичных мезенхимальных стволовых клеток на основе определения новых нейровизуализационных, иммунологических и нейрофизиологических предикторов функционального состояния головного мозга.

Материалы и методы

Проведение клеточной терапии с использованием аутологичных МСК было рассмотрено и получило одобрение этического комитета учреждения.

Забор материала для получения МСК от пациентов и введение после экспансии (и нейрогенной индукции) *in vitro* проводился на основании информированного согласия пациента.

Критерии включения пациентов в исследование: пациенты обоего пола от 18 до 55 лет; резистентные формы эпилепсии с симптомами органического поражения головного мозга, частыми эпилептическими приступами, с появлением тяжелых постприступных состояний и эпилептических статусов, когда любые комбинации 2-3 основных противосудорожных средств, включая новейшие, не оказывают заметного влияния на частоту и тяжесть приступов.

Критерии исключения: воспалительные процессы (менингоэнцефалиты, в т.ч. вирусной этиологии, паразитарные заболевания); хронически протекающие психозы с частыми декомпенсациями, слабоумием и выраженной социальной дезадаптацией; наличие хронических соматических и неврологических заболеваний в стадии обострения, требующих активной терапии; неудовлетворительные показатели комплексного клинико-инструментального обследования; опухоли головного мозга; пациенты серопозитивные по анти-ВГС, HBsAg и ВИЧ (основание – инструкция «О порядке предоперационной заготовки аутологичной крови и ее компонентов» утвержденная Приказом МЗ РБ № 981 от 03.09.12 г.).

Пунктат костного мозга (ПКМ) общим объемом 25-55 мл забирали в две пробирки с антикоагулянтом гепарином из расчета 50 единиц гепарина на 1 мл пунктата. В течение часа пробирки транспортировали в лабораторию в термоконтейнере для перевозки биологического материала.

В лаборатории оценивали качество ПКМ. Пунктат перемешивали и определяли наличие сгустков. При их наличии сгустки удаляли простой седиментацией в течение 1 мин. Пунктат, освобожденный от сгустков, объединяли в одной пробирке и отбирали 0,5-1 мл для подсчета ядросодержащих клеток. В итоге получали так называемый «полезный объем ПКМ».

Под наблюдением находились 20 пациентов (12 мужчин и восемь женщин) с фармакорезистентной симптоматической эпилепсией в возрасте 23-46 лет, длительность болезни – 7-29 лет.

Наиболее частыми этиологическими факторами являлись: нейроинфекция – восемь пациентов; пери-

натальная патология – восемь пациентов; черепно-мозговая травма – четыре пациента. Частота приступов у всех пациентов – высокая – более трех в месяц.

Первично-генерализованные судорожные приступы (ГСП) отмечались у шести пациентов; парциальные (с вторичной генерализацией) – у четырех; полиморфные приступы – у 10 пациентов.

Общее клиническое исследование проводилось согласно протоколам обследования психических и неврологических пациентов: объективный осмотр, тщательное клинико-лабораторное и функциональное обследование, консультации невролога, терапевта, психиатра, окулиста, отоларинголога, психолога и др., структурированное психиатрическое интервью, нейровизуализация, электроэнцефалография (ЭЭГ), компьютерная ЭЭГ, видеомониторирование ЭЭГ.

С целью уменьшения риска побочных эффектов трансплантацию проводили в два этапа:

I. Недифференцированные МСК: однократно медленно внутривенно вводилось 40-100 млн клеток в 20,0 физиологического раствора + 5% аутологичной сыворотки. Жизнеспособность клеток – 98%.

II. Через 5-7 дней после I этапа в спинномозговой канал вводилось 3-8 млн нейроиндуцированных клеток в 5,0 физиологического раствора + 5% аутологичной сыворотки. Жизнеспособность клеток составляла 98%.

Оценку безопасности терапии МСК проводили путем оценки лабораторной и клинико-нейрофизиологической реакции пациентов на процедуру введения клеточного материала. Результаты трансплантации МСК оценены в сроки наблюдения 3-36 мес. после их введения. Тяжесть состояния пациентов оценивали в соответствии с клинико-нейрофизиологическими и патопсихологическими критериями. Для балльной оценки клинических критериев использовали общепринятый русскоязычный вариант Национальной госпитальной шкалы тяжести приступов NHS-3.

Получение первичной культуры МСК и наращивание клеточной массы проводится следующим образом. После оценки качества первичной клеточной массы и подсчета ядросодержащих клеток 6 мл (или в среднем 17,9% от полезного объема) костномозгового пунктата вносится в культуральный флакон T175 в 30 мл полной питательной среды (ППС).

Из основного объема пунктата выделяются мононуклеары. Костный мозг разводится фосфатно-солевым буфером в соотношении 1:1, наносится наградиент плотности фиколл-пак (ρ-1077 г/л) и центрифугируется в режиме 400 g 30 мин. Трансферной пипеткой отбирается фракция мононуклеаров на границе раздела плазмы и градиента, переносится в центрифужные пробирки и дважды отмывается фосфатно-солевым буфером с 1% сыворотки АВ (IV) при 400 g 10 мин. Осадок мононуклеаров ресуспендируется в полной питательной среде.

Для приготовления полной питательной среды используются: α-MEM (Lonza, cat № BE02-002F) – 95%; сыворотка АВ (IV) человека – 5%; раствор антибиотиков пенициллин/стрептомицин (1000-кратный).

Проводится подсчет ядросодержащих клеток в камере Горяева. Затем отбирается часть суспензии, содержащей $0{,}5\times10^6$ и $1{,}0\times10^6$ клеток для определения числа колониеобразующих единиц фибробластов.

Основная часть мононуклеаров для получения первичной культуры вносится в посевной концентрации $0{,}23\times10^6$/см^2-$1{,}00\times10^6$/см^2 в культуральные флаконы. Флаконы помещаются в CO^2-инкубатор при 37^{0}С. Через 48 ч для удаления не прикрепившихся клеток поверхность флакона дважды промывается фосфатно-солевым буфером и вносится свежая ППС. Культивирование продолжается со сменой питательной среды каждые три дня до стадии образования хорошо развитого слоя фибробластоподобных клеток. Затем клетки снимаются с поверхности пластика раствором 0,25% трипсина с ЭДТА в течение 5-7 мин., ресуспендируются в фосфато-солевом буфере с 1% сыворотки АВ (IV), однократно отмываются в режиме 400g 8 мин. и подсчитываются в камере Горяева.

После достижения первичной культурой достаточной плотности роста клетки снимаются, подсчитываются и высеиваются в новые культуральные флаконы. Из флаконов удаляется ППС, промывается адгезионная поверхность 20 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) и вносится по 4 мл 0,25% раствора трипсина-ЭДТА на 3-7 мин. После открепления клеток трипсин нейтрализовывается 8 мл ФСБ, содержащего 1% сыворотки АВ (IV), и отмывается в режиме 400g 10 мин. Клетки из всех флаконов объединяются в одной пробирке, разводятся питательной средой, подсчитываются и высеиваются в новые культуральные флаконы в 30 мл ППС и посевной концентрации $2{,}0$-$4{,}0\times10^3$/см^2 (первый пассаж). Для получения достаточного количества клеток культура наращивается на протяжении 2-3 пассажей.

В процессе культивирования на каждом этапе необходимо микроскопически анализировать морфологию клеток и их пролиферативную активность. Показателями пролиферативной активности служат: кратность прироста клеточной массы (индекс пролиферации), число удвоений, время удвоения.

После наращивания достаточного количества клеточной массы основная часть интактных клеток снимается для внутривенного введения пациенту, а МСК из четырех флаконов T175 нейроиндуцируются в течение 6-7 дней.

Колониеобразующие единицы фибробластов (КОЕ-Ф тест) применяют для оценки количества пролиферирующих мезенхимальных стволовых клеток, приходящихся на 100 тыс. мононуклеарных клеток костного мозга. Клетки колонии являются потомками одной клетки-предшественницы.

Для постановки КОЕ-Ф теста $0{,}5\times10^6$ и $1{,}0\times10^6$ мононуклеаров, выделенных из костного мозга, высеваются в чашки (d=100 мм) для культур клеток в 10 мл

полной питательной среды и помещаются в CO^2-инкубатор. Через 9-14 дней после формирования хорошо развитых дискретных колоний проводится учет КОЕ-Ф теста. Из чашек удаляется ППС, адгезионная поверхность промывается ФСБ, клетки фиксируются этанолом в течение 15 мин. После удаления этанола чашки подсушиваются на воздухе при комнатной температуре и под инвертированным микроскопом учитываются колонии фибробластоподобных клеток. Определяется количество КОЕ-Ф на 100 тыс.

В работе используется: нейроиндукционная среда KnockOut DMEM/F-12 (Gibco, REF: 12660-012, LOT: 1699730); Neural Supplement (Gibco, REF: A10508-01); глютамакс 200 mM (Gibco, REF: 35050-038, LOT: 1401778), FGFb (Gibco/Invitrogen, кат. №PHG0024) с конечной концентрацией 20 нг/мл; EGF (Gibco/Invitrogen, кат. №PHG0314) с конечной концентрацией 20 нг/мл (все – производства Thermo Fisher Scientific, США).

Из флаконов удаляется ППС, адгезионная поверхность промывается 20 мл ФСБ и вносится 30 мл нейроиндукционной среды. Флаконы помещаются в CO^2-инкубатор на семь дней со сменой среды каждые три дня. В процессе дифференцировки анализируется морфология клеток, контролируется стерильность. Через семь дней нейроиндуцированные МСК снимаются для введения в спинномозговой канал методом люмбальной пункции.

После завершения культивирования и нейроиндукции клетки, предназначенные для трансплантации, промываются физиологическим раствором и снимаются с адгезионной поверхности 0,25% раствором трипсина-ЭДТА. Открепившиеся клетки ресуспендируются в растворе натрия хлорида 0,9% для инфузий с 1% сыворотки пациента и дважды отмываются центрифугированием в режиме 400g 10 мин.

Отмытые интактные МСК суспендируются в 20 мл, а нейроиндуцированные МСК – в 5 мл раствора натрия хлорида 0,9% для инфузий с добавлением 5% аутологичной сыворотки. Отбирается 0,1 мл суспензии клеток для подсчета и определения жизнеспособности клеток, $0{,}5\times10^6$-$1{,}0\times10^6$ клеток для контроля стерильности, $0{,}5\times10^6$-$1{,}0\times10^6$ клеток – для определения фенотипа и $0{,}5\times10^6$-$1{,}0\times10^6$ – для определения маркеров нейрогенеза. Кроме того, $0{,}5\times10^6$-$1{,}0\times10^6$ МСК замораживаются и закладываются на хранение – контрольный образец. Далее раствором натрия хлорида изотоническим 0,9% для инфузий с добавлением 5% аутологичной сыворотки доводится объем суспензии интактных МСК для внутривенного введения до 20,0 мл, а объем нейроиндуцированных МСК для эндолюмбального введения – до 5,0 мл. Емкости с клеточными трансплантатами асептически запечатываются, снабжаются этикетками и помещаются в термоконтейнер для транспортировки. Трансплантаты хранятся и транспортируются в термоконтейнере при температуре от 4°С до 10°С.

Время от момента суспендирования клеток в физиологическом растворе с 5% аутологичной сыворотки до клинического применения не превышает два часа.

Этикетка содержит информацию об организации производителе, ФИО пациента, названии трансплантата, его объеме, количестве клеток, времени и дате производства, способе введения, условий хранения и срока годности.

Для определения жизнеспособности клеток в пробирке смешивается суспензия клеток с 0,4% раствором трипанового синего в соотношении 1:1 и заполняется камера Горяева. Погибшие клетки диффузно окрашиваются в голубой цвет. Жизнеспособность суспензии оценивается по количеству клеток, которые исключают трипановый синий, и выражается в процентном отношении к общему количеству клеток.

Трансплантат представляет собой суспензию клеток в растворе натрия хлорида 0,9% для инфузий с добавлением 5% аутологичной сыворотки. Объем трансплантата интактных МСК для внутривенного введения составляет 20 мл с общим содержанием клеток не менее $35{,}0\times10^6$, объем трансплантата нейроиндуцированных МСК – 5 мл с общим содержанием клеток не менее $5{,}0\times10^6$.

Клетки 2-3 пассажей, фибробластоподобной морфологии с жизнеспособностью не менее 95%, фенотипом по маркерам CD 90+>95%, CD 105+>95%, CD 34+<5%, CD 45+<5%; культура стерильна (отсутствуют аэробные и анаэробные бактерии, грибы).

Для определения маркеров нейрогенеза в образцах МСК костного мозга после нейрогенной индукции выделяется РНК не менее чем из 500 тыс. клеток реагентом TRItidy (PanReac AppliChem, ФРГ – Испания) по протоколу производителя. Концентрации образцов определяются методом спектрофотометрии на приборе Specord 250 (Analytik Jena AG, ФРГ), соотношения оптической плотности A260/230 и A260/280 были не ниже 2:1. РНК разводится в безнуклеазной воде и хранится при -80°С.

В обратную транскрипцию берется 0,5-2 мкг тотальной РНК, 4 мкл 5-кратного буфера для обратной транскриптазы, 20 единиц ингибитора РНКаз, 1 мМ дНТФ, 0,5 мкг праймера Oligo(dT)18, 0,2 мкг рассеянных гексамеров, 200 единиц обратной транскриптазы RevertAid Premium (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Объем одной реакционной смеси доводится водой и составляет 20 мкл. Образцы подвергаются начальному отжигу при 25°С с последующей инкубацией при 50°С в течение 30 мин. и инактивацией обратной транскриптазы при 85°С в течение 5 мин.

Дизайн праймеров для ПЦР проводится с помощью онлайн-алгоритма PrimerBLAST, последовательности олигонуклеотидов анализируются на предмет образования шпилек и димеров с помощью онлайн-сервиса OligoAnalyzer 3.1 (IDT, США). Последовательности праймеров к специфическим маркерам: к нейрон-специфической енолазе (NSE) –

Таблица 1. Панель для определения популяционного и субпопуляционного составов лимфоцитов периферической крови у пациентов с эпилепсией.

Table 1. Experimental design for the identification of lymphocytes populations and subpopulations in the peripheral blood of patients with epilepsy.

Моноклональное антитело/ Monoclonal antibody	№ п/п	Флуорохром / Fluorochrome					
		FITC	PE	PE-Cy5	PE-Cy7	APC	APC-Cy7
	Tube 1	CD3	CD57	CD45RA	CD4	CD56	CD8
	Tube 2	CD4	CD38	CD3	CD25	HLA-DR	CD8
	Tube 3	CD45R0	CD38	CD45RA	CD4	CD19	CD8
	Tube 4	TcRγδ	CD3	CD19	CD4	CD95	CD8

acaggccagatcaagactggtgcc (прямой), gcagaggaatcacagcacactggg (обратный) (размер ампликона 147 п.н.); к нестину (NES) – ctggcgcacctcaagatgtccct (прямой), tccagcttggggtcctgaaagct (обратный) (размер ампликона 132 п.н.), к map2 – tgtcacagtggaggaagcagca (прямой), agcgcttttctgggctcttggtt (обратный) (размер ампликона 110 п.н.); к глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP) – cggctggaggttgagagggacaa (прямой), agggtggcttcatctgcttcctgt (обратный) (размер ампликона 137 п.н.). Последовательности праймеров к конститутивным маркерам: к катехол-О-метилтрансферазе (COMT) – gcttctcttggaggaatgtgg (прямой), cacgtgtgctaggaagtctg (обратный) (размер ампликона 97 п.н.); к фосфоглицераткиназе (PGK) – cggtagtccttatgagccac (прямой), aacagaacatccttgcccag (обратный) (размер ампликона 115 п.н.).

Состав реакционной смеси включает 2,5 мкл 2-кратного буфера (конечная концентрация MgCl2 – 3,5 мМ), 0,8 мМ дНТФ, 0,5 мкМ каждого из праймеров, 0,02 ед/мкл полимеразы, 0,5-кратную концентрацию интеркалятора ZUBR Green I (все реагенты производства Праймтех, Беларусь), 0,5-1 мкл кДНК. Конечный объем реакционной смеси составляет 10 мкл. Образцы разносятся в 8-луночные стрипы (Bio-Rad Laboratories, Inc., США), ПЦР проводится на приборе C1000 Touch с оптическим модулем CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Программа включает начальную активацию полимеразы при 95°C в течение 10 мин. и 40 циклов: 95°C – 30 с, 65°C – 60 с.

Запись флуоресцентного сигнала, расчет значений Cq и анализ данных проводятся с помощью управляющей программы термоциклера Bio-Rad CFX Manager 3.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США).

Фенотипический профиль МСК определяется по выраженности/отсутствию поверхностных антигенов CD90, CD105, CD34, CD45, CD19 и CD14 методом прямой иммунофлуоресценции.

В работе для идентификации МСК применяются поверхностные антиген-специфичные моноклональные антитела (МКА) в комбинации CD14-FITC/CD90-PE, CD19-FITC/CD105-PE, CD45-FITC/CD34-PE. В качестве контроля аутофлуоресценции и неспецифического связывания моноклональных антител используются неокрашенные МСК и изотипический контроль, соответствующий подклассу иммуноглобулинов применяемых моноклональных антител.

Изолированные МСК отмываются фосфатно-солевым буферным раствором и ресуспендируются в 0,5 мл инкубационного раствора в конечной концентрации $5{,}0\times10^5$-$1{,}0\times10^6$. В маркированные соответствующим образом пробирки вносится по 100 мкл клеточной суспензии и добавляются МКА. Мягко смешиваются на автоматическом встряхивателе и инкубируются в соответствии с протоколом. Дважды отмываются ФСБ при 1500 об./мин. в течение 5 мин. Удаляется надосадок и клетки ресуспендируются в 200 мкл холодного (40°C) 1% раствора параформальдегида. Учитываются результаты на проточном цитофлуориметре не позднее 24 ч после фиксации клеток.

Проведена комплексная оценка иммунологического статуса у пациентов с эпилепсией. Популяционный и субпопуляционный состав иммунокомпетентных клеток периферической крови выявлялся методом прямой иммунофлуоресценции на проточном цитофлуориметре BD FACSCantoII (Becton Dickinson, США), программное обеспечение BD FACSDiva v7.0. В качестве маркеров использовали моноклональные антитела, меченные флуорохромом. Выбор исследуемых антигенов лимфоцитов определялся их линейной принадлежностью к Т- (CD3, CD4, CD8), В- (CD19) и ЕК- (CD56, CD57) клеткам, а также их значимостью в реализации функциональной активности лимфоцитов (CD25, CD38, CD95, HLA-DR). Расширенная панель для иммунофенотипирования образцов периферической крови пациентов представлена в **таблице 1**.

Аналитическая цитометрия проводится на проточном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson, США) с 15 мВт аргон-ионным лазером. Проточный цитометр калибруется в соответствии с инструкцией производителя с использованием нагруженных флу-

Таблица 2. Популяционный состав Т-лимфоцитов периферической крови пациентов с эпилепсией до и после введения мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

Table 2. Composition of T-lymphocyte populations from peripheral blood of patients with epilepsy before and after the administration of mesenchymal stem cells (MSC).

Популяция лимфоцитов/ Lymphocyte population	Популяционный состав Т-лимфоцитов / Composition of T-lymphocyte population		
	Здоровые лица, % n=20 / Healthy subjects	Пациенты с эпилепсией до введения МСК, % n=20 / Patients with epilepsy before cell injection	Пациенты с эпилепсией после введения МСК, % n=18 / Patients with epilepsy after cell injection
CD3+	69,67±6,82	69,84±7,99	69,58±3,52
CD3+CD4+	48,14±7,01	43,23±6,13	45,95±3,46
CD3+CD8+	25,42±3,20	27,29±3,96	23,02±2,27▪
ИРИ	1,89±0,33	1,68±0,68	1,97±0,45
CD4+CD25^{hi}	4,48±1,26	4,47±1,44	3,15±0,65
CD4+CD8+	1,11±0,59	2,19±1,08***	0,90±0,62 ▪*

Примечание. Данные представлены в виде M±sd, где M – среднее значение; sd – стандартное отклонение; n – число наблюдений; ИРИ – иммунорегуляторный индекс (соотношение CD3+CD4+/CD3+CD8+).

**Достоверность различий между показателями групп пациентов с эпилепсией и условно здоровых лиц по критерию Стьюдента: *** p<0,001.*

▪Достоверность различий между показателями групп пациентов с эпилепсией по критерию Стьюдента до и после введения МСК: ▪ p<0,05.

Note. The data are presented as M ± sd, where M is the mean; sd is the standard deviation; n is the number of observations; ИРИ is the immunoregulatory index (i.e. the ratio of CD3 + CD4 + / CD3 + CD8 +).

** Significance of the differences between the patients with epilepsy and (conditionally) healthy subjects according to the Student's test: *** p<0.001.*

▪ Significance of the differences between the patients with epilepsy before and after the injection of MSC, according to the Student's test: ▪ p<0,05.

орохромом микробусов "CaliBRITE" (Becton Dickinson, США) и программы AutoCOMP (Becton Dickinson, США) для установки PMT-вольтажа, флуоресцентной компенсации, а также для контроля инструментальной чувствительности, наиболее оптимальной для использования. Для возбуждения флуоресценции используется монохроматический луч лазера с длиной волны 488 нм. В этом же луче измеряется переднее (FSC) и боковое (SSC) под углом 90° светорассеивание анализируемых клеток.

Регистрация данных производится с использованием программного обеспечения SELLQuest Software (Becton Dickinson, США). МСК оцениваются после выделения логического «гейта» в Dot/Plot по их линейному (FSC) и боковому (SSC) светорассеиванию. Степень чистоты – не менее 98%. Для расчета процентного содержания маркированных клеток, характеризующего изучаемую популяцию, используется статистический пакет программы CELLQuest (Becton Dickinson, США). На пробу анализируется не менее 30 000 клеток.

При оценке полученной клеточной культуры в качестве контрольных значений используются минимальные критерии определения МСК, принятые ISCT (International Society for Cellular Therapy – Международное общество клеточной терапии) в 2006 г.

Результаты и обсуждение

Пациенты обычно хорошо переносили процедуру трансплантации аутологичных МСК.

Только в одном случае из 40 после эндолюмбального введения аутологичных МСК отмечалась головная боль, обусловленная постпункционной ликворной гипотензией, которая была купирована в течение двух часов.

Клиническое состояние оценивалось через 3-6-12 мес. после трансплантации МСК у пациентов с фармакорезистентной симптоматической эпилепсией исследуемой группы и группы сравнения.

При анализе динамики пароксизмальных проявлений эпилепсии выявлено, что наибольший эффект получен у пациентов с ГСП: полное прекращение приступов отмечалось у трех (в течение 6 мес.), значительное уменьшение (более 50%) частоты приступов – у 12 пациентов.

Из пяти пациентов со сложными парциальными (психомоторными) приступами полное прекращение приступов отмечалось у двух, значительное уменьшение или трансформация в более легкие формы – у трех.

Из 20 пациентов группы сравнения нестойкий клинический эффект (снижение частоты приступов на 50%) наблюдался у пяти пациентов и отмечался

Таблица 3. Субпопуляционный состав В-лимфоцитов периферической крови пациентов с эпилепсией до и после введения мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

Table 3. Subpopulations of peripheral blood B-lymphocytes in patients with epilepsy before and after the mesenchymal stem cell (MSC) administration.

Субпопуляция лимфоцитов / Subpopulation of lymphocytes	Субпопуляционный состав В-лимфоцитов / Composition of B-lymphocyte subpopulation		
	Здоровые лица, % n=20 / Healthy subjects	Пациенты с эпилепсией до введения МСК, % n=20 / Patients with epilepsy before cell injection	Пациенты с эпилепсией после введения МСК, % n=18 / Patients with epilepsy after cell injection
CD19+	8,89±2,89	9,26±3,38	7,40±2,86
CD19+CD38+	4,21±1,74	5,63±2,12	6,53±2,05*
CD19+CD95+	3,16±2,65	4,44±2,74	3,73±2,72
CD19+CD45R0+	–	1,69±0,40	1,40±0,83
CD19+CD45RA+	–	7,43±4,56	7,70±3,70

Примечание. Данные представлены в виде M±sd, где M – среднее значение; sd – стандартное отклонение; n – число наблюдений.

**Достоверность различий между показателями групп пациентов с эпилепсией и условно здоровых лиц по критерию Стьюдента: *p<0,05.*

Note. The data are presented as M±sd, where M is the mean; sd is the standard deviation; n is the number of observations.

**Significance of the differences between the patients with epilepsy and (conditionally) healthy subjects according to the Student's test: *p<0.001.*

в течение 1-2-6 мес., затем к 12 мес. наблюдения частота приступов возвращалась к прежнему уровню.

Анализ ЭЭГ-данных показал, что наиболее чувствительными показателями активности/ремиссии эпилептического процесса являются: индекс пароксизмальности, средняя локальная когерентность (эпилептический треугольник).

В культурах МСК, подвергнутых дифференцировке в нейрогенном направлении, определяли молекулярные маркеры: нейрон-специфическую енолазу (NSE), нестин (NES), ассоциированный с микротрубочками белок 2 (MAP2) и глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP). Образцы РНК, выделенные из культур МСК костного мозга пациентов до и после нейрогенной индукции, подвергали обратной транскрипции и полученную одноцепочечную кДНК анализировали методом ПЦР в реальном времени. Нормализация образцов проводилась с использованием конститутивных маркеров COMT и PGK.

Патогенез эпилепсии представляет собой конечный результат сложного динамического взаимодействия внутренних процессов на молекулярном, внутриклеточном, межнейрональном, системном и организменном уровнях [42]. Гипотеза об участии иммунных механизмов в патогенезе эпилепсии впервые была высказана A. E. Walker (1969). В последующие годы O. Eeg-Olofsson и соавт. (1986) выявили аномалии соотношения субпопуляций CD4/CD8 у пациентов с эпилепсией. Таким образом, к настоящему времени получены данные, свидетельствующие о взаимосвязи эпилепсии с иммунными нарушениями, что позволяет отнести этот вид патологии в группе иммунозависимых заболеваний с прогредиентным течением [42].

Проведена комплексная оценка иммунологического статуса у пациентов с эпилепсией.

У пациентов с эпилепсией не отмечено существенных изменений в популяционном составе Т-клеток: на фоне сохраненного относительно значений здоровых доноров уровня CD3+ Т-лимфоцитов (69,67±6,82) содержание CD3+CD4+ Т-лимфоцитов-хелперов и CD3+CD8+ Т-цитотоксических лимфоцитов практически не изменялось после введения МСК (**табл. 2**).

Снижение относительного количества CD3+CD8+ Т-цитотоксических клеток после курса клеточной терапии (27,29±6,96 до введения МСК и 23,02±2,27 после введения) было статистически значимым (p<0,05). Иммунорегуляторный индекс (ИРИ – баланс Т-хелперов/Т-цитотоксических лимфоцитов), отражающий состояние Т-звена иммунитета, у пациентов до введения МСК был незначительно снижен относительно нормы (1,89±0,33) и составлял 1,68±0,68, после введения МСК он достиг нормальных значений и составил 1,97±0,45. Содержание естественных регуляторных Т-клеток не изменено. Выявлено значимое увеличение CD4+CD8+ Т-клеток до начала клеточной терапии (2,19±1,08; p<0,001). К настоящему времени установлено, что представители данной субпопуляции лимфоцитов являются высокодифференцированными клетками памяти. Значение увеличения количества этих клеток остается во многом необъяснимым, хотя считается, что дубль-позитивные Т-лимфоциты могут иметь большое значение в реакциях адаптивного иммунитета. Появление в периферической крови CD4+CD8+ Т-лимфоцитов является признаком активации цитотоксических Т-лимфоцитов и может свидетельствовать о наличии

Таблица 4. Содержание активированных Т-лимфоцитов в периферической крови пациентов с эпилепсией до и после введения мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

Table 4. Content of activated T-lymphocytes in the peripheral blood of patients with epilepsy before and after the administration of mesenchymal stem cells (MSC).

Популяция лимфоцитов / Lymphocyte population	Содержание активированных Т-лимфоцитов / Content of activated T-lymphocytes		
	Здоровые лица, % n=20 / Healthy subjects	Пациенты с эпилепсией до введения МСК, % n=20 / Patients with epilepsy before cell injection	Пациенты с эпилепсией после введения МСК, % n=18 / Patients with epilepsy after cell injection
CD3+CD38+	23,85±10,60	27,46±12,48	25,13±12,54
CD3+CD25+	7,76±3,55	12,49±7,06**	12,86±8,11*
CD3+HLA-DR+	9,73±4,55	12,09±7,20	11,34±5,73
CD3+CD95+	49,27±11,66	30,35±12,24***	45,85±5,75▪

Примечание. Данные представлены в виде M±sd, где M – среднее значение; sd – стандартное отклонение; n – число наблюдений.

**Достоверность различий между показателями групп пациентов с эпилепсией и условно здоровых лиц по критерию Стьюдента: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ▪ p<0,05 – достоверность различий между показателями групп пациентов.*

Note. The data are presented as M±sd, where M is the mean; sd is the standard deviation; n is the number of observations.

** Significance of the differences between the patients with epilepsy and (conditionally) healthy subjects according to the Student's test: * p<0.05,** p<0.01; *** p<0.001; ▪ p<0.05 – Significance of the differences between the groups of patients.*

аутоиммунного компонента в характере иммунного реагирования. После введения МСК количество CD4+CD8+ клеток снизилось и составило 0,90±0,62 (p<0,05).

На основании предварительных данных можно предположить, что введение МСК способствует уменьшению содержания дубль-позитивных Т-лимфоцитов в 2,4 раза, а также снижению в 1,2 раза относительного количества цитотоксических CD3+CD8+-клеток (p<0,05) на фоне тенденции к повышению уровня CD3+CD4+-клеток, способствует нормализации баланса хелперных/цитотоксических Т-клеток и свидетельствуют о вероятности затухания клинических проявлений, связанных с аутоиммунным компонентом эпилепсии.

Относительное содержание В-лимфоцитов, отражающее гуморальное звено иммунитета, у пациентов до и после введения МСК определялось по экспрессии CD19. В-лимфоциты выполняют в организме две роли: обеспечивают продукцию антител и участвуют в представлении антигенов Т-лимфоцитам. Количество CD19+ В-клеток у пациентов с эпилепсией детектируется в пределах нормы (5-15%) и составляет 9,26±3,38 до введения МСК и 7,40±2,86 после (**табл. 3**).

CD38 является маркером активации клеток, определяется на поверхности ряда лейкоцитов, включая CD4+ и CD8+ Т-клетки, В-лимфоциты и натуральные киллеры (НК). CD38 также принимает участие в реакциях клеточной адгезии, сигнальной трансдукции и регуляции внутриклеточного Ca^{2+}. Потеря функциональной активности CD38 связана с нарушением иммунного ответа, обмена веществ. Выявлено увеличение активированных В-лимфоцитов у пациентов с эпилепсией после курса терапии МСК (p<0,05) относительно их содержания в популяции В-клеток контрольной группы, что свидетельствует о повышении их энергообмена. Количество CD19+CD45R0+ (наиболее «зрелые» и активированные В-клетки) и CD19+CD45RA+ (покоящиеся В-лимфоциты) у пациентов с эпилепсией после введения МСК оставались на исходном уровне.

Изучено относительное содержание активированных Т-лимфоцитов. В качестве маркеров активации использованы антитела к CD25, CD38, CD95 и HLA-DR (**табл. 4**).

CD95 (Fas/APO-1) относится к семейству рецепторов TNF. Запускает в клетке физиологический апоптоз после взаимодействия со своим лигандом (FasL), передает также цитотоксический сигнал и участвует в подавлении иммунных реакций, участвует в клональной селекции Т- и В-лимфоцитов. Апоптоз способствует удалению активированных зрелых Т-клеток и продуцирующих антитела В-клеток в конце иммунного ответа, элиминацию при помощи цитотоксических Т- и НК-клеток вирусинфицированных и опухолевых клеток. Экспрессия CD95 Т-клетками после терапии увеличилась (p<0,05). Данный эффект, возможно, связан с компенсаторными механизмами поддержания иммунологического гомеостаза и требует изучения на большей выборке пациентов.

Лимфоциты, экспрессирующие CD56 и CD57, способны распознавать «свое»/«чужое», обладают цитотоксической активностью и отвечают за противоопухолевый и противовирусный иммунитет. У пациентов с эпилепсией отмечено увеличение относительного содержания как «истинных» натуральных киллеров

Таблица 5. Субпопуляционный состав «натуральных» киллеров и Т-клеток, обладающих естественной киллерной активностью, в периферической крови пациентов с эпилепсией до и после введения мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

Table 5. Subpopulation of «natural» killers and T-cells with the natural killer activity, in the peripheral blood of patients with epilepsy before and after the administration of mesenchymal stem cells (MSCs).

Субопуляция лимфоцитов / Lymphocyte subpopulation	Субпопуляционный состав «натуральных» киллеров и Т-клеток, обладающих естественной киллерной активностью (M±sd) / Subpopulations of «natural» killers and T-cells with the natural killer activity		
	Здоровые лица, % n=20 / Healthy subjects	Пациенты с эпилепсией до введения МСК, % n=20 / Patients with epilepsy before cell injection	Пациенты с эпилепсией после введения МСК, % n=18 / Patients with epilepsy after cell injection
CD57+	7,12±4,15	18,46±10,32***	12,92±6,55*
CD16+CD56+	18,67±4,28	35,17±13,86***	25,72±4,72**
CD3+CD16+CD56+	6,38±3,92	12,28±6,00***	17,16±3,77***
CD3-CD16+CD56+	13,62±5,31	14,23±5,92	13,37±4,60
CD3+CD57+	4,78±2,27	11,51±8,54**	7,27±1,72*
CD3-CD57+	5,36±2,86	8,47±5,27*	6,49±4,39
CD4+CD57+	0,22±0,10	2,12±3,36*	0,55±0,11***
CD8+CD56+	–	8,84±4,16	6,24±2,28
CD8+CD57+	2,50±1,35	2,84±1,80	1,48±1,25
CD8+CD3-	4,73±2,01	7,25±4,18*	3,58±2,93
CD57+CD56+	–	2,14±1,63	6,05±4,35
CD57-CD56+	–	22,88±10,04	24,40±9,97

** p<0,05; ** p<0,01; **** p<0,001 – достоверность различий между показателями групп пациентов с эпилепсией и условно здоровых лиц по критерию Стьюдента.*

** p<0.05; ** p<0.01; **** p<0,001 – Significance of the differences between the patients with epilepsy and (conditionally) healthy subjects according to the Student's test.*

(НК), экспрессирующих молекулы CD16, CD56 и CD57, так и CD3+ клеток, обладающих киллерной активностью (**табл. 5**).

Повышенная экспрессия молекулы CD57 связана с увеличением продукции IFNγ и более выраженной литической активностью, опосредованной CD16R. Увеличение относительного содержания CD3+CD57+ (преимущественно за счет CD4+CD57+ клеток), а также CD3-CD57+ клеток у пациентов с эпилепсией может быть обусловлено аутоиммунным компонентом заболевания, связанным с наличием аутоантител к широкому спектру нейроспецифических антигенов: белку S-100, основному белку миелина, галактоцереброзидам С первого типа, антигену нейрональных мембран, что свидетельствует о наличии деструктивного процесса в ЦНС [43-45]. Нами выявлена тенденция к снижению содержания данных субпопуляций у пациентов после проведения курса клеточной терапии МСК, что может свидетельствовать о снижении активности патологического процесса. Однако относительные количества CD57+ клеток так и не достигли значений группы сравнения (здоровые лица).

У пациентов с эпилепсией отмечен высокий уровень относительного содержания TcRγδ+ Т-хелперов (1,19±0,57; норма 0,48±0,33; p<0,001), который сохранялся и после введения МСК (1,47±0,45; p<0,001) (**табл. 6**).

TcRγδ+ Т-клетки представляют собой небольшую популяцию клеток с видоизмененным Т-клеточным рецептором. Предполагается, что γδ Т-лимфоциты участвуют в узнавании липидных антигенов. До настоящего времени функции TcRγδ+ Т-клеток полностью не изучены. Считается, что субпопуляция TcRγδ+ Т-клеток служит одним из связующих компонентов между врожденным и приобретенным иммунитетом и является одним из наиболее ранних барьеров на пути патогенов. Кроме того, эти клетки, секретируя цитокины, играют важную иммунорегуляторную роль и способны дифференцироваться в цитотоксические лимфоциты. Увеличение циркулирующей субпопуляции γδ-Т-клеток позволяет предположить недавнюю или текущую хроническую антигенную стимуляцию у пациентов, страдающих эпилепсией.

Однозначным фенотипическим признаком дифференцировки покоящихся наивных CD45RA+ CD45R0+ Т-лимфоцитов человека в покоящиеся Т-клетки памяти принято считать появление на поверхности клеток молекул CD45R0 взамен изоформы CD45RA. Таким образом, наивные Т-клетки (CD45RA+) и Т-клетки памяти (CD45R0+) обладают функциональными и фенотипическими особенностями, а экспрессия на клеточной поверхности различных изоформ молекулы CD45 позволяет разделить Т-лимфоциты человека на наивные Т-клетки

Таблица 6. Субпопуляционный состав TcRγδ+ Т-лимфоцитов у пациентов с эпилепсией до и после введения мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

Table 6. Subpopulation of TcRγδ + T-lymphocytes in patients with epilepsy before and after the administration of mesenchymal stem cells (MSC).

Популяция лимфоцитов / Lymphocyte population	Субпопуляционный состав TcRγδ+ Т-лимфоцитов / Subpopulations of TcRγδ+ T-lymphocytes		
	Здоровые лица, % n=20 / Healthy subjects	Пациенты с эпилепсией до введения МСК, % n=20 / Patients with epilepsy before cell injection	Пациенты с эпилепсией после введения МСК, % n=18 / Patients with epilepsy after cell injection
TcRγδ+	5,89±2,27	4,41±1,72	4,30±1,31
TcRγδ+CD3+	3,58±0,24	3,43±0,80	3,10±2,27
TcRγδ+CD3-	0,98±0,63	1,02±0,51	1,17±0,84
TcRγδ+CD4+	0,48±0,33	1,19±0,57***	1,47±0,45***
TcRγδ+CD8+	–	1,24±0,77	1,10±0,95
CD4+CD8+	1,11±0,59	2,19±1,08***	0,90±0,62 ▪

** Достоверность различий между показателями групп пациентов с эпилепсией и условно здоровых лиц по критерию Стьюдента: *** p<0,001;*

▪ достоверность различий между показателями групп пациентов с эпилепсией до и после терапии: ▪ p<0,05.

** Significance of the differences between the patients with epilepsy and (conditionally) healthy subjects according to the Student's test: *** p<0.001;*

▪ Significance of the differences between the patients with epilepsy before and after the injection of MSC according to the Student's test ▪ p<0.05.

и Т-клетки памяти. Данная особенность позволяет выявить три субпопуляции Т-лимфоцитов человека: покоящиеся наивные CD45RA+CD45R0-Т-клетки, покоящиеся CD45RA-CD45R0+Т-клетки памяти и активированные CD45RA+CD45R0+ Т-клетки. Изучение субпопуляционного состава Т-клеток по экспрессии CD45R0 и CD45RA не выявило изменений в содержании наивных Т-клеток и Т-клеток памяти (**табл. 7**).

Таким образом, у пациентов с эпилепсией отмечены изменения в структуре популяций иммунокомпетентных клеток. Наиболее существенные сдвиги выявлены в уровнях цитотоксических и активированных клеток. Ввиду незначительной выборки в группе пациентов, получивших клеточную терапию, сформулировать значимые выводы пока не представляется возможным. Однако можно предположить, что вторичный аутоиммунный процесс, возникающий вследствие нарушения целостности гематоэнцефалического барьера, способен влиять на течение болезни. Важным представляется также выявление изменений иммунологических показателей, отражающих течение эпилептического процесса, от из-

Таблица 7. Содержание наивных Т-лимфоцитов и Т-лимфоцитов памяти у пациентов с эпилепсией до и после введения мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

Table 7. Content of naive T-lymphocytes and memory T-lymphocytes in patients with epilepsy before and after the administration of mesenchymal stem cells (MSCs).

Популяция лимфоцитов / Lymphocyte population	Содержание наивных Т-лимфоцитов и Т-лимфоцитов памяти / Content of naïve T-lymphocytes and memory T-lymphocytes		
	Здоровые лица, % n=20 / Healthy subjects	Пациенты с эпилепсией до введения МСК, % n=20 / Patients with epilepsy before cell injection	Пациенты с эпилепсией после введения МСК, % n=18 / Patients with epilepsy after cell injection
CD3+CD45RA+	40,18±8,70	45,12±14,32	38,10±14,89
CD4+CD45R0+	29,10±9,59	23,71±11,05	27,57±7,55
CD4+CD45RA+	19,99±7,71	17,18±0,26	20,05±3,59
CD8+CD45R0+	9,06±4,85	12,19±6,75	12,07±4,52
CD8+CD45RA+	16,70±6,63	19,06±8,75	17,62±2,78
CD45R0+CD45RA+	10,10±2,31	6,54±4,87	9,40±0,98

Примечание. Данные представлены в виде M±sd, где M – среднее значение; sd – стандартное отклонение; n – число наблюдений.

Note. The data are presented as M ± sd, where M is the mean; sd is the standard deviation; n is the number of observations.

менений, вызванных лечением самого заболевания, и других процессов, влияющих на иммунный статус.

Заключение

В исследовании представлены первые результаты клинического применения МСК для терапии пациентов с резистентной эпилепсией. Во-первых, использовались аутологичные стволовые клетки во избежание иммунной сенсибилизации трансплантированных клеток. Во-вторых, для клинического применения использовались генетически неизмененные стволовые клетки, чтобы избежать перепрограммирования стволовых клеток или использования экзогенной ДНК, которые несут риск нестабильности генома и генетических мутаций с неизвестными последствиями в долгосрочной перспективе. В-третьих, использовались два метода доставки клеток в головной мозг (внутривенный, эндолюмбальный).

Исследован иммунный статус пациентов до введения аутологичных МСК и после окончания курса клеточной терапии. У пациентов с симптоматической эпилепсией наиболее существенные сдвиги выявлены в уровнях цитотоксических и активированных клеток, а также натуральных киллеров и Т-клеток с киллерной активностью. После проведения курса клеточной терапии отмечается достоверное снижение CD4+CD8+, CD3+CD8+, CD3+CD95+, CD8+CD25+ клеток. Снижается также содержание натуральных киллеров и Т-клеток с киллерной активностью, однако их уровень остается достоверно высоким по сравнению с показателями группы сравнения.

Наше исследование не закончено, но представленные данные наглядно продемонстрировали безопасность применения трансплантации МСК для лечения резистентной эпилепсии. Мы не выявили никаких неблагоприятных реакций и осложнений, изменений лабораторных или клинических показателей после применения клеточной терапии. Кроме того, в исследуемой группе пациентов отмечались положительные эффекты терапии (в т.ч. ремиссия более 6 мес.), в отличие от пациентов из группы сравнения.

Первый опыт проведения клеточной терапии пациентам с эпилепсией в Республике Беларусь показал, что внутривенное введение аутологичных МСК и эндолюмбальное введение нейроиндуцированных аутологичных МСК может быть эффективной дополнительной терапией выбора у пациентов с фармакорезистентной формой заболевания. Полученные предварительные данные подтверждают безопасность, а также перспективность использования стволовых клеток человека для терапии пациентов с эпилепсией.

Литература:

1. Hauser W. A., Kurland L. T. The epidemiology of epilepsy in Rochester, Minnesota, 1935 through 1967. Epilepsia. 1975; 16 (1): 1-66.
2. Fisher R. S., van Emde Boas W., Blume W. et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epi-lepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). Epilepsia. 2005; 46 (4): 470-472.
3. Fisher R. S., Acevedo C., Arzimanoglou A. et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. Epilepsia. 2014; 55 (4): 475-482. DOI: 10.1111/epi.12550.
4. Jobst B. C., Cascino G. D. Resective epilepsy surgery for drug-resistant focal epilepsy: a review. JAMA. 2015; 313 (3): 285-293.
5. Доклад о ситуации в области неинфекционных заболеваний в мире 2014 г. ВОЗ. 19 января 2015.
6. Mason C., Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. Regen Med. 2008; 3 (1): 1-5.
7. Turner L. P., Selling Stem Cells in the USA: Assessing the Direct-to-Consumer Industry. CellStemCell. 2016; 19 (2): 154-7.
8. Пядушкина Е. А., Фролов М. Ю. Клинико-экономическое исследование препарата лакосамид у больных с парциальной эпилепсией. ФАРМАКОЭКОНОМИКА. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология. 2016; 9 (3): 38-47.
9. Докукина Т. В., Голубева Т. С., Матвейчук И. В., Махров М. В., Лосева В. М., Крупенькина Е. В., Марчук С. А. Результаты фармакоэпидемиологического исследования эпилепсии в Белоруссии. ФАРМАКОЭКОНОМИКА. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология. 2014; 7 (2): 33-37.
10. Одинцова Г. В., Куралбаев А. К., Нездоровина В. Г., Абрамов К. Б., Павловская М. Е., Телегина А. А., Берснев В. П. Хирургическое лечение височной эпилепсии: проблемы и эффективность (на примере клинического случая). Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2017; 9 (2): 41-49.
11. Мкртчян В. Р., Сергеев А. М., Почигаева К. И., Шпак И. А. Влияние на бюджет добавления перампанела к терапии больных эпилепсией в возрасте 12 лет и старше при парциальных приступах с вторичной генерализацией и без нее и при первично-генерализованных тонико-клонических приступах в условиях Российской Федерации. ФАРМАКОЭКОНОМИКА. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология. 2016; 9 (2): 28-37.
12. Воронина Т. А., Авакян Г. Г., Неробкова Л. Н., Литвинова С. А., Авакян Г. Н. Новые биомолекулярные мишени для создания протовоэпилептических препаратов. Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2015; 7 (4): 59-65.
13. Мазина Н. К., Мазин П. В., Кислицын Ю. В., Маркова Е. М. Фармакоэкономические аспекты применения руфинамида при синдроме Леннокса-Гасто. ФАРМАКОЭКОНОМИКА. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология. 2016; 9 (1): 15-22.
14. Асатрян Э. А., Абрамов К. Б., Маматханов М. Р., Лебедев К. Э., Ефимцев А. Ю., Забродская Ю. М., Себелев К. И., Рыжкова Д. В., Труфанов Г. Е., Хачатрян В. А. Диагностика и результаты хирургического лечения эпилепсии у детей со структурными изменениями головного мозга. Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2017; 9 (1): 40-50.
15. Хлебоказов Ф. П., Докукина Т. В., Игнатенко С. И., Космачева С. М., Гончарова Н. В., Потапнев М. П., Махров М. В., Королевич П. П., Мисюк Н. Н., Григорьева И. В., Марчук С. А. Опыт применения аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга в лечении пациентов с симптоматической эпилепсией. Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2014; 6 (1): 6-14.
16. Chu K., Kim M., Jung K. H. et al. Human neural stem cell transplantation reduces spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus in adult rats. Brain Res. 2004; 1023 (2): 213-221.
17. Shetty A. K., Upadhya D. GABA-ergic cell therapy for epilepsy: Advances, limitations

and challenges. Neurosci Biobehav Rev. 2016; 62: 35-47.
18. Waldau B., Hattiangady B., Kuruba R., Shetty A. K. Medial Ganglionic Eminence-derived Neural Stem Cell Grafts Ease Spontaneous Seizures and Restore GDNF Expression in a Rat Model of Chronic Temporal Lobe Epilepsy. Stem Cells. 2010; 28 (7): 1153-1164.
19. Huang P. Y., Shih Y. H., Tseng Y. J., Ko T. L., Fu Y. S., Lin Y. Y. Xenograft of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly as a potential therapy for rat pilocarpineinduced epilepsy. Brain Behav Immun. 2016; 54: 45-58.
20. Long Q., Qiu B., Wang K., Yang J., Jia C., Xin W. et al. Genetically engineered bone marrow mesenchymal stem cells improve functional outcome in a rat model of epilepsy. Brain Res. 2013; 1532: 1-13.
21. Acharya M. M., Hattiangady B., Shetty A. K. Progress in neuroprotective strategies for preventing epilepsy. Prog Neurobiol. 2008; 84: 363-404.
22. Shetty A. K., Hattiangady B. Concise review: prospects of stem cell therapy for temporal lobe epilepsy. Stem Cells. 2007; 25: 2396-407.
23. Roper S. N., Steindler D. A. Stem cells as a potential therapy for epilepsy. Exp Neurol. 2013; 244: 59-66.
24. Abdanipour A., Tiraihi T., Delshad A. Trans-differentiation of the adipose tissue-derived stem cells into neuron-like cells expressing neurotrophins by selegiline. Iran Biomed J. 2011; 15: 113-21.
25. Huicong K., Zheng X., Furong W., Zhouping T., Feng X., Qi H. et al. The imbalanced expression of adenosine receptors in an epilepsy model corrected using targeted mesenchymal stem cell transplantation. Mol Neurobiol. 2013; 48: 921-30.
26. Leal M. M., Costa-Ferro Z.S., Souza B. S., Azevedo C. M., Carvalho T. M., Kaneto C. M. et al. Early transplantation of bone marrow mononuclear cells promotes neuroprotection and modulation of inflammation after status epilepticus in mice by paracrine mechanisms. Neurochem Res. 2014; 39: 259-68.
27. Costa-Ferro Z.S., Vitola A. S., Pedroso M. F., Cunha F. B., Xavier L. L., Machado D. C. et al. Prevention of seizures and reorganization of hippocampal functions by transplantation of bone marrow cells in the acute phase of experimental epilepsy. Seizure. 2010; 19: 84-92.
28. Costa-Ferro Z.S., Souza B. S., Leal M. M., Kaneto C. M., Azevedo C. M., da Silva I. C. et al. Transplantation of bone marrow mononuclear cells decreases seizure incidence, mitigates neuronal loss and modulates pro-inflammatory cytokine production in epileptic rats. Neurobiol Dis. 2012; 46: 302-13.
29. Costa-Ferro Z.S., de Borba C. F., de Freitas Souza B. S., Leal M. M., da Silva A. A., de Bellis Kuhn T. I. et al. Antiepileptic and neuroprotective effects of human umbilical cord blood mononuclear cells in a pilocarpine-induced epilepsy model. Cytotechnology. 2014; 66: 193-9.
30. Agadi S., Shetty A. K. Concise review: prospects of bone marrow mononuclear cells and mesenchymal stem cells for treating status epilepticus and chronic epilepsy. Stem Cells. 2015; 33: 2093-103.
31. Abdanipour A., Tiraihi T., Mirnajafi-Zadeh J. Improvement of the pilocarpine epilepsy model in rat using bone marrow stromal cell therapy. Neurol Res. 2011; 33: 625-32.
32. Voulgari-Kokota A., Fairless R., Karamita M., Kyrargyri V., Tseveleki V., Evangelidou M. et al. Mesenchymal stem cells protect CNS neurons against glutamate excitotoxicity by inhibiting glutamate receptor expression and function. Exp Neurol. 2012; 236: 161-70.
33. Hunt R. F., Girskis K. M., Rubenstein J. L., Alvarez-Buylla A., Baraban S. C. GABA progenitors grafted into the adult epileptic brain control seizures and abnormal behavior. Nat Neurosci. 2013; 16: 692-7.
34. Cunningham M., Cho J. H., Leung A, Savvidis G., Ahn S., Moon M. et al. hPSC-derived maturing GABAergic interneurons ameliorate seizures and abnormal behavior in epileptic mice. Cell Stem Cell. 2014; 15: 559-73.
35. Lee H., Yun S., Kim I.S, Lee I. S., Shin J. E., Park S. C. et al. Human fetal brain-derived neural stem/progenitor cells grafted into the adult epileptic brain restrain seizures in rat models of temporal lobe epilepsy. PLoS ONE. 2014; 9: e104092.
36. Li T., Ren G., Kaplan D. L., Boison D. Human mesenchymal stem cell grafts engineered to release adenosine reduce chronic seizures in a mouse model of CA3-selective epileptogenesis. Epilepsy Res. 2009; 84: 238-41.
37. Yang C. C., Shih Y. H., Ko M. H., Hsu S. Y., Cheng H., Fu Y. S. Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly after complete transection of the rat spinal cord. PLoS ONE. 2008; 3: e3336.
38. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 2006; 126 (4): 663-676.
39. Shi Z., Zhang J., Chen S. et al. Conversion of fibroblasts to parvalbumin neurons by one transcription factor, Ascl1, and the chemical compound forskolin. J Biol Chem. 2016; 291 (26): 13560-70.
40. Shakhbazau A., Mishra M., Chu T. H., Brideau C., Cummins K., Tsutsui S. Fluorescent phosphorus dendrimer as a spectral nanosensor for macrophage polarization and fate tracking in spinal cord injury. Macromol Biosci. 2015; 15: 1523-34.
41. Rao G., Mashkouri S., Aum D., Marcet P., Borlongan C. V. Contemplating stem cell therapy for epilepsy-induced neuropsychiatric symptoms. Neuropsychiatric Disease and Treatment 2017; 13: 585-596.
42. Lipatova L. V. Neuro-immune mechanism of epilepsy as a key to pathogenetic treatment of the disease. Epilepsiya i paroksizmal'nye sostoyaniya / Epilepsy and paroxysmal conditions (in Russian). 2010; 2 (3): 20-27.
43. Блинов Д. В. Пациенты с неврологическими расстройствами: обоснование необходимости фармакоэкономической оценки оптимизации затрат на ведение с использованием нейроспецифических белков в качестве маркеров повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера. ФАРМАКОЭКОНОМИКА. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология. 2014; 7 (1): 40-45.
44. Блинов Д. В. Белковые маркеры гипоксически-ишемического поражения ЦНС в перинатальном периоде. Акушерство, гинекология и репродукция. 2016; 10 (2): 55-63.
45. Маджидова Ё. Н., Рахимбаева Г. С., Азизова Р. Б. Нейроиммунопатогенетические механизмы эпилепсии. Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2014; 6 (1): 15-18.

References:

1. Hauser W. A., Kurland L. T. The epidemiology of epilepsy in Rochester, Minnesota, 1935 through 1967. *Epilepsia*. 1975; 16 (1): 1-66.
2. Fisher R. S., van Emde Boas W., Blume W. et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epi-lepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*. 2005; 46 (4): 470-472.
3. Fisher R. S., Acevedo C., Arzimanoglou A. et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014; 55 (4): 475-482. DOI: 10.1111/epi.12550.
4. Jobst B. C., Cascino G. D. Resective epilepsy surgery for drug-resistant focal epilepsy: a review. *JAMA*. 2015; 313 (3): 285-293.
5. Report on the global situation of noncommunicable diseases 2014 by who. 19 January 2015 [*Doklad o situatsii v oblasti neinfektsionnykh zabolevanii v mire 2014 g. VOZ. 19 yanvarya 2015* (in Russian)].
6. Mason C., Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. *Regen Med*. 2008; 3 (1): 1-5.
7. Turner L. P., Selling Stem Cells in the USA: Assessing the Direct-to-Consumer Industry. *CellStemCell*. 2016; 19 (2): 154-7.
8. Pyadushkina E. A., Frolov M. Yu. *FARMAKOEKONOMIKA. Sovremennaya farmakoekonomika i farmakoepidemiologiya*

/ FARMAKOEKONOMIKA. Modern pharmacoeconomics and pharmacoepidemiology (in Russian). 2016; 9 (3): 38-47. DOI:10.17749/2070-4909.2016.9.3.038-047.
9. Dokukina T.V., Golubeva T.S., Matveichuk I.V., Makhrov M.V., Loseva V.M., Krupen'kina E.V., Marchuk S.A. *FARMAKOEKONOMIKA. Sovremennaya farmakoekonomika i farmakoepidemiologiya / FARMAKOEKONOMIKA. Modern pharmacoeconomics and pharmacoepidemiology* (in Russian). 2014; 7 (2): 33-37.
10. Odintsova G.V., Kuralbaev A.K., Nezdorovina V.G., Abramov K.B., Pavlovskaya M.E., Telegina A.A., Bersnev V.P. *Epilepsiya i paroksizmal'nye sostoyaniya / Epilepsy and paroxysmal conditions* (in Russian). 2017; 9 (2): 41-49. DOI: 10.17749/2077-8333.2017.9.2.041-049.
11. Mkrtchyan V.R., Sergeev A.M., Pochigaeva K.I., Shpak I.A. *FARMAKOEKONOMIKA. Sovremennaya farmakoekonomika i farmakoepidemiologiya / FARMAKOEKONOMIKA. Modern pharmacoeconomics and pharmacoepidemiology* (in Russian). 2016; 9 (2): 28-37. DOI: 10.17749/2070-4909.2016.9.2.028-037
12. Voronina T.A., Avakyan G.G., Nerobkova L.N., Litvinova S.A., Avakyan G.N. *Epilepsiya i paroksizmal'nye sostoyaniya / Epilepsy and paroxysmal conditions* (in Russian). 2015; 7 (4): 59-65. DOI: 10.17749/2077-8333.2015.7.4.059-065.
13. Mazina N.K., Mazin P.V., Kislitsyn Yu.V., Markova E.M. *FARMAKOEKONOMIKA. Sovremennaya farmakoekonomika i farmakoepidemiologiya / FARMAKOEKONOMIKA. Modern pharmacoeconomics and pharmacoepidemiology* (in Russian). 2016; 9 (1): 15-22. DOI: 10.17749/2070-4909.2016.9.1.015-022.
14. Asatryan E.A., Abramov K.B., Mamatkhanov M.R., Lebedev K.E., Efimtsev A. Yu., Zabrodskaya Yu.M., Sebelev K.I., Ryzhkova D.V., Trufanov G.E., Khachatryan V.A. *Epilepsiya i paroksizmal'nye sostoyaniya / Epilepsy and paroxysmal conditions* (in Russian). 2017; 9 (1): 40-50. DOI: 10.17749/2077-8333.2017.9.1.040-050.
15. Khlebokazov F.P., Dokukina T.V., Ignatenko S.I., Kosmacheva S.M., Goncharova N.V., Potapnev M.P., Makhrov M.V., Korolevich P.P., Misyuk N.N., Grigor'eva I.V., Marchuk S.A. *Epilepsiya i paroksizmal'nye sostoyaniya / Epilepsy and paroxysmal conditions* (in Russian). 2014; 6 (1): 6-14.
16. Chu K., Kim M., Jung K.H. et al. Human neural stem cell transplantation reduces spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus in adult rats. *Brain Res*. 2004; 1023 (2): 213-221.
17. Shetty A.K., Upadhya D. GABA-ergic cell therapy for epilepsy: Advances, limitations and challenges. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016; 62: 35-47.
18. Waldau B., Hattiangady B., Kuruba R., Shetty A.K. Medial Ganglionic Eminence-derived Neural Stem Cell Grafts Ease Spontaneous Seizures and Restore GDNF Expression in a Rat Model of Chronic Temporal Lobe Epilepsy. *Stem Cells*. 2010; 28 (7): 1153-1164.
19. Huang P.Y., Shih Y.H., Tseng Y.J., Ko T.L., Fu Y.S., Lin Y.Y. Xenograft of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly as a potential therapy for rat pilocarpineinduced epilepsy. *Brain Behav Immun*. 2016; 54: 45-58.
20. Long Q., Qiu B., Wang K., Yang J., Jia C., Xin W. et al. Genetically engineered bone marrow mesenchymal stem cells improve functional outcome in a rat model of epilepsy. *Brain Res*. 2013; 1532: 1-13.
21. Acharya M.M., Hattiangady B., Shetty A.K. Progress in neuroprotective strategies for preventing epilepsy. *Prog Neurobiol*. 2008; 84: 363-404.
22. Shetty A.K., Hattiangady B. Concise review: prospects of stem cell therapy for temporal lobe epilepsy. *Stem Cells*. 2007; 25: 2396-407.
23. Roper S.N., Steindler D.A. Stem cells as a potential therapy for epilepsy. *Exp Neurol*. 2013; 244: 59-66.
24. Abdanipour A., Tiraihi T., Delshad A. Trans-differentiation of the adipose tissue-derived stem cells into neuron-like cells expressing neurotrophins by selegiline. *Iran Biomed J*. 2011; 15: 113-21.
25. Huicong K., Zheng X., Furong W., Zhouping T., Feng X., Qi H. et al. The imbalanced expression of adenosine receptors in an epilepsy model corrected using targeted mesenchymal stem cell transplantation. *Mol Neurobiol*. 2013; 48: 921-30.
26. Leal M.M., Costa-Ferro Z.S., Souza B.S., Azevedo C.M., Carvalho T.M., Kaneto C.M. et al. Early transplantation of bone marrow mononuclear cells promotes neuroprotection and modulation of inflammation after status epilepticus in mice by paracrine mechanisms. *Neurochem Res*. 2014; 39: 259-68.
27. Costa-Ferro Z.S., Vitola A.S., Pedroso M.F., Cunha F.B., Xavier L.L., Machado D.C. et al. Prevention of seizures and reorganization of hippocampal functions by transplantation of bone marrow cells in the acute phase of experimental epilepsy. *Seizure*. 2010; 19: 84-92.
28. Costa-Ferro Z.S., Souza B.S., Leal M.M., Kaneto C.M., Azevedo C.M., da Silva I.C. et al. Transplantation of bone marrow mononuclear cells decreases seizure incidence, mitigates neuronal loss and modulates pro-inflammatory cytokine production in epileptic rats. *Neurobiol Dis*. 2012; 46: 302-13.
29. Costa-Ferro Z.S., de Borba C.F., de Freitas Souza B.S., Leal M.M., da Silva A.A., de Bellis Kuhn T.I. et al. Antiepileptic and neuroprotective effects of human umbilical cord blood mononuclear cells in a pilocarpine-induced epilepsy model. *Cytotechnology*. 2014; 66: 193-9.
30. Agadi S., Shetty A.K. Concise review: prospects of bone marrow mononuclear cells and mesenchymal stem cells for treating status epilepticus and chronic epilepsy. *Stem Cells*. 2015; 33: 2093-103.
31. Abdanipour A., Tiraihi T., Mirnajafi-Zadeh J. Improvement of the pilocarpine epilepsy model in rat using bone marrow stromal cell therapy. *Neurol Res*. 2011; 33: 625-32.
32. Voulgari-Kokota A., Fairless R., Karamita M., Kyrargyri V., Tseveleki V., Evangelidou M. et al. Mesenchymal stem cells protect CNS neurons against glutamate excitotoxicity by inhibiting glutamate receptor expression and function. *Exp Neurol*. 2012; 236: 161-70.
33. Hunt R.F., Girskis K.M., Rubenstein J.L., Alvarez-Buylla A., Baraban S.C. GABA progenitors grafted into the adult epileptic brain control seizures and abnormal behavior. *Nat Neurosci*. 2013; 16: 692-7.
34. Cunningham M., Cho J.H., Leung A, Savvidis G., Ahn S., Moon M. et al. hPSC-derived maturing GABAergic interneurons ameliorate seizures and abnormal behavior in epileptic mice. *Cell Stem Cell*. 2014; 15: 559-73.
35. Lee H., Yun S., Kim I.S, Lee I.S., Shin J.E., Park S.C. et al. Human fetal brain-derived neural stem/progenitor cells grafted into the adult epileptic brain restrain seizures in rat models of temporal lobe epilepsy. *PLoS ONE*. 2014; 9: e104092.
36. Li T., Ren G., Kaplan D.L., Boison D. Human mesenchymal stem cell grafts engineered to release adenosine reduce chronic seizures in a mouse model of CA3-selective epileptogenesis. *Epilepsy Res*. 2009; 84: 238-41.
37. Yang C.C., Shih Y.H., Ko M.H., Hsu S.Y., Cheng H., Fu Y.S. Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly after complete transection of the rat spinal cord. *PLoS ONE*. 2008; 3: e3336.
38. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126 (4): 663-676.
39. Shi Z., Zhang J., Chen S. et al. Conversion of fibroblasts to parvalbumin neurons by one transcription factor, Ascl1, and the chemical compound forskolin. *J Biol Chem*. 2016; 291 (26): 13560-70.
40. Shakhbazau A., Mishra M., Chu T.H., Brideau C., Cummins K., Tsutsui S. Fluorescent phosphorus dendrimer as a spectral nanosensor for macrophage polarization and fate tracking in spinal cord injury. *Macromol Biosci*. 2015; 15: 1523-34.
41. Rao G., Mashkouri S., Aum D., Marcet P., Borlongan C.V. Contemplating stem cell therapy for epilepsy-induced neuropsychiatric symptoms. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2017; 13: 585-596.
42. Lipatova L.V. Neuro-immune mechanism of epilepsy as a key to pathogenetic treatment of the disease. *Epilepsiya i paroksizmal'nye sostoyaniya / Epilepsy and paroxysmal conditions* (in Russian). 2010; 2 (3): 20-27.
43. Blinov D.V. Patsienty s nevrologicheskimi rasstroĭstvami: obosnovanie neobkho-dimosti farmakoekonomicheskoĭ otsenki

optimizatsii zatrat na vedenie s ispol'zovaniem neĭrospetsificheskikh belkov v kachestve markerov povysheniya pronitsaemosti gematoentsefalicheskogo bar'era. *FARMAKOEKONOMIKA. Sovremennaya farmakoekonomika i farmakoepidemiologiya / FARMAKOEKONOMIKA. Modern pharmacoeconomics and pharmacoepidemiology.* 2014; 7 (1): 40-45.

44. Blinov D. V. *Akusherstvo, ginekologiya i reproduktsiya / Obstetrics, gynecology and reproduction.* 2016; 10 (2): 55-63. DOI: 10.17749/2313-7347.2016.10.2.055-063.
45. Madzhidova E. N., Rakhimbaeva G. S., Azizova R. B. *Epilepsiya i paroksizmal'nye sostoyaniya / Epilepsy and paroxysmal conditions* (in Russian). 2014; 6 (1): 15-18.

Сведения об авторах:

Докукина Татьяна Васильевна – д.м.н., заместитель директора по научной работе, Республиканский научно-практический центр психического здоровья. E-mail: polak0208@mail.ru.

Потапнев Михаил Петрович – д.м.н., профессор, Белорусский государственный медицинский университет. E-mail: mpotapnev@yandex.by.

Космачева Светлана Михайловна – к.м.н., заведующий лабораторией биологии и генетики стволовых клеток, Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий. E-mail: 4kosmacheva@mail.ru.

Хлебоказов Федор Петрович – к.м.н., заведующий отделением по лечению психических расстройств вследствие эпилепсии, Республиканский научно-практический центр психического здоровья. E-mail: fhlebokazov@mail.ru.

Слобина Елена Леонидовна – к.м.н., ведущий научный сотрудник, Российский научный центр рентгенрадиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации. E-mail: e.slobina@gmail.com.

Голубева Татьяна Сергеевна – к.б.н., ведущий научный сотрудник отдела психических и поведенческих расстройств, Республиканский научно-практический центр психического здоровья. E-mail: tatyana.gol2011@yandex.by.

Мисюк Николай Николаевич – к.м.н., врач функциональной диагностики, Республиканский научно-практический центр психического здоровья. E-mail: polak0208@mail.ru.

Махров Михаил Валерьевич – научный сотрудник отдела психических и поведенческих расстройств, Республиканский научно-практический центр психического здоровья. E-mail: michele2001@mail.ru.

Шамрук Ирина Викторовна – научный сотрудник отдела психических и поведенческих расстройств, Республиканский научно-практический центр психического здоровья. E-mail: azolina87@tut.by.

Королевич Павел Павлович – научный сотрудник отдела психических и поведенческих расстройств, Республиканский научно-практический центр психического здоровья. E-mail: ppalych_82@mail.ru.

Мартыненко Александр Ильич – лаборант отдела психических и поведенческих расстройств, Республиканский научно-практический центр психического здоровья. E-mail: m.a.y.alexandr@gmail.com.

Быченко Илья Викторович – лаборант отдела психических и поведенческих расстройств, Республиканский научно-практический центр психического здоровья. E-mail: ugvmc@mail.ru.

Будько Татьяна Олеговна – младший научный сотрудник отдела психических и поведенческих расстройств, Республиканский научно-практический центр психического здоровья. E-mail: tatsiana71@gmail.com.

About the authors:

Dokukina Tatiana Vasilievna – MD, Deputy Director for Research, Republican Scientific and Practical Center of Mental Health, Republic of Belarus. E-mail: polak0208@mail.ru.

Potapnev Mikhail Petrovich – MD, Professor, Belarusian State Medical University. E-mail: mpotapnev@yandex.by.

Kosmacheva Svetlana Mikhailovna – MD, PhD, Head, Laboratory of Biology and Genetics of Stem Cells, Republican Scientific and Practical Center of Transfusiology and Medical Biotechnologies, Republic of Belarus. E-mail: 4kosmacheva@mail.ru.

Khlebokazov Fyodor Petrovich – MD, PhD, Head, Department for the Treatment of Epilepsy Associated Mental Disorders, Republican Scientific and Practical Center of Mental Health, Republic of Belarus. E-mail: fhlebokazov@mail.ru.

Slobina Elena Leonidovna – MD, PhD, Leading Researcher, Russian Research Center for X-ray Radiology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation. E-mail: e.slobina@gmail.com.

Golubeva Tatiana Sergeevna – PhD, Leading Researcher, Department of Mental and Behavioral Disorders, Republican Scientific and Practical Center of Mental Health, Republic of Belarus. E-mail: tatyana.gol2011@yandex.by.

Misyuk Nikolai Nikolaevich – MD, PhD (Functional diagnostics), Republican Scientific and Practical Center of Mental Health, Republic of Belarus. E-mail: polak0208@mail.ru.

Makhrov Mikhail Valerievich – Researcher, Department of Mental and Behavioral Disorders, Republican Scientific and Practical Center of Mental Health, Republic of Belarus. E-mail: michele2001@mail.ru.

Shamruk Irina Viktorovna – Researcher, Department of Mental and Behavioral Disorders, Republican Scientific and Practical Center of Mental Health, Republic of Belarus. E-mail: azolina87@tut.by.

Korolyevich Pavel Pavlovich – Researcher, Department of Mental and Behavioral Disorders, Republican Scientific and Practical Center of Mental Health, Republic of Belarus. E-mail: ppalych_82@mail.ru.

Martynenko Alexander Ilyich – Laboratory Assistant, Department of Mental and Behavioral Disorders, Republican Scientific and Practical Center of Mental Health, Republic of Belarus. E-mail: m.a.y.alexandr@gmail.com.

Bychenko Ilya Viktorovich – Laboratory Assistant, Department of Mental and Behavioral Disorders, Republican Scientific and Practical Center of Mental Health, Republic of Belarus. E-mail: ugvmc@mail.ru.

Budko Tatyana Olegovna – Junior Researcher, Department of Mental and Behavioral Disorders, Republican Scientific and Practical Center of Mental Health, Republic of Belarus. E-mail: tatsiana71@gmail.com.