

АУТОЛОГИЧНЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КОСТНОГО МОЗГА В КОМБИНИРОВАННОМ ЛЕЧЕНИИ ФАРМАКОРЕЗИСТЕНТНОЙ ЭПИЛЕПСИИ

Хлебоказов Ф. П.¹, Докукина Д. В.¹, Потапнев М. П.², Космачева С. М.²,
Шамрук И. В.¹, Орлова С. В.³, Слобина Е. Л.¹, Мартыненко А. И.¹

¹ РНПЦ психического здоровья,

² РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий,

³ РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

AUTOLOGOUS MESENCHYMAL STEM CELLS OF BONE MARROW IN COMBINED TREATMENT OF PHARMACORESISTANT EPILEPSY

Hlebokazov F.¹, Dakukina T.¹, Potapnev M.², Kosmacheva S.², Shamruk I.¹,
Orlova S.³, Slobina E.¹, Martynenka A.¹

¹ Republican Scientific and Practical Center for Mental Health, Minsk, Belarus.

² Republican Scientific and Practical Center for Transfusion and Medical Biotechnology, Minsk, Belarus.

³ The Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ — разработка метода лечения эпилепсии с использованием аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (АМСК КМ), оценка их безопасности и эффективности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Проведена оценка показателей 15 пациентов с фармакорезистентными формами эпилепсии, которым, наряду с постоянным приемом противоэпилептических лекарственных средств, вводились АМСК КМ и группы сравнения, состоявшей из 20 пациентов. Эффективность лечения после трансплантации АМСК КМ оценивалась у 10 пациентов через 6–12 и более месяцев от начала лечения по клиническому состоянию, данным ЭЭГ.

ВЫВОДЫ. Приведенные данные подтверждают безопасность и перспективность использования АМСК КМ для терапии пациентов с фармакорезистентной эпилепсией. Установлено, что при курсовой терапии АМСК КМ может быть достигнуто значительное улучшение у пациентов с первично- и вторично-генерализованными судорожными приступами, сложными парциальными психомоторными пароксизмами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: аутологичные мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (АМСК КМ), эпилепсия, фармакорезистентность, пациенты с симптоматической эпилепсией, ЭЭГ, нейровизуализация, бета-герпесвирусы.

MATERIALS AND METHODS. The indicators of 15 patients with pharmacoresistant forms of epilepsy were evaluated, who, along with the constant intake of antiepileptic drugs, were administered AMSC BM and a comparison group consisting of 20 patients. The effectiveness of treatment after AMSC BM transplantation was evaluated in 10 patients after 6, 12 or more months from the beginning of the treatment according to the clinical condition and EEG data.

SUMMARY. These data confirm the safety and prospects of using AMSC BM for the treatment of patients with pharmacoresistant epilepsy. It was found that the course therapy AMSC BM can be achieved significant improvement in patients with primary and secondary generalized seizures, complex partial psychomotor paroxysms.

THE AIM OF THE STUDY was to develop a method for the treatment of epilepsy using autologous mesenchymal stem cells of bone marrow (AMSC BM), assess their safety and effectiveness.

KEY WORDS: autologous mesenchymal bone marrow stem cells (AMSC BM), epilepsy, pharmacoresistance, patients with symptomatic epilepsy, EEG, neuroimaging, beta-herpesviruses.

Введение.

Использование в лечении эпилепсии высокоэффективных противоэпилептических лекарственных средств позволило в последнее время добиться не только контроля над приступами, но и улучшить качество жизни пациентов. Однако в ряде случаев развиваются резистентные к фармакотерапии формы эпилепсии, характеризующиеся частыми приступами, продуктивными психопатологическими расстройствами [4]. В связи с этим в современной медицинской практике при лечении пациентов с фармакорезистентной эпилепсией большое зна-

чение придается и другим методам воздействия наряду с применением противоэпилептических лекарственных средств. Одним из таких перспективных направлений медицины в настоящее время является регенеративная медицина, в частности трансплантация АМСК КМ, которые можно получить в достаточно большом количестве и задавать направление их дифференцировки в нужном направлении формируя 3 главных типа клеток — астроциты, олигодендроциты, нейроны [1,3,5,9,10].

Цель исследования заключалась в разработке метода лечения эпилепсии с использованием аутоло-

гичных мезенхимальных стволовых клеток, оценке их безопасности и эффективности.

Материалы и методы.

В исследование вошли 15 пациентов с фармако-резистентными формами эпилепсии, которым, наряду с постоянным приемом противоэпилептических лекарственных средств, вводились АМСК КМ. Из них одной пациентке проведено три курса введения АМСК КМ (внутривенно и эндолюмбально), 10-ти — по 2 и 3-м — по одному. Забор костного мозга проводили в асептических условиях, под местной анестезией, с аспирацией из гребня подвздошной кости 40–43мл костного мозга. Пациенты хорошо переносили процедуру трансплантации АМСК КМ. Только в 1 случае из 15 отмечалась головная боль, обусловленная постпункционной ликворной гипотензией; у 1 пациента — тошнота, рвота после эндолюмбального введения АМСК КМ, которые купировались без дополнительного вмешательства. Группа сравнения состояла из 20 пациентов, которые получали только противоэпилептическую лекарственную терапию. Эффективность лечения после трансплантации АМСК КМ оценивалась у 10 пациентов через 12 и более месяцев от начала лечения по клиническому состоянию, данным рутинной ЭЭГ, картирования ЭЭГ, видео ЭЭГ-мониторирования.

Критериями включения являлись:

- пациенты обоего пола от 18 до 55 лет;
- резистентные формы эпилепсии с симптомами органического поражения головного мозга, с 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.

Противопоказанием к применению являлись:

- острые и хронические заболевания в стадии декомпенсации;
- добро- и злокачественные новообразования головного мозга.

Состояние пациентов оценивалось по клиническим проявлениям, данным психологической и лабораторной диагностики (клеточный, гуморальный иммунитет, общий и биохимический анализ крови). При проведении нейрофизиологической диагностики определялись следующие показатели ЭЭГ: наличие и выраженность пароксизмальной активности (индекс пароксизмальности), наличие патологического фокусирования бета-активности (бета1 и бета2, по пересечению изолинии и по соединению вершин), индексы медленной активности в узких диапазонах (дельта2-, тета1- и тета2), значения пиковой и средней частоты альфа-ритма. Исследовалось наличие или отсутствие патологической инверсии частотно-пространственной структуры альфа-ритма. Анализировались данные средней локальной когерентности. Нейровизуализация осуществлялась с помощью метода МРТ по программе «Эпилепсия» [2]. Кроме

того, проводились исследования на бета-герпесвирусы, которые могут быть этиологическим фактором или сопутствующей инфекцией при эпилепсии. Детекцию ДНК вирусов герпеса 6 и 7 типа (ВЧГ-6 и ВЧГ-7), вируса Эпштейн Бара (ВЭБ) и цитомегаловируса (ЦМВ) проводили в сыворотке и лейкоцитах крови, ликворе методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени до начала курсовой терапии АМСК КМ и после [6].

Результаты.

Наибольший эффект получен у пациентов с генерализованными судорожными приступами. Полное прекращение приступов отмечено у 7 пациентов. У 2-х пациентов полностью прекратились первично-генерализованные и у 2 вторично-генерализованные судорожные приступы, но сохраняются простые парциальные моторные, зрительные, речевые частотой 2–3 раза в месяц. У одной пациентки при стрессовых ситуациях отмечаются диссоциативные приступы при полном прекращении генерализованных судорожных. У 2-х пациентов через 12 и более месяцев от начала лечения клиническая ремиссия в виде полного отсутствия судорожных приступов сохранялась 10 месяцев, затем приступы возобновились, но они носят более легкий, abortивный характер. Значительное уменьшение (более 50%) частоты генерализованных судорожных приступов отмечено у 3. Из 5 пациентов со сложными парциальными (психомоторными) приступами: полное прекращение приступов наблюдалось у 3, значительное уменьшение или трансформация их в более легкие формы — у 2, без улучшения — у 1 (Рис. 1).

Среди пациентов группы сравнения (20 человек), получавших стандартную фармакотерапию, урежение судорожных приступов на 50% и более отмечено в 7 случаях в течение 2–6 месяцев, затем к 12 месяцам наблюдения частота приступов возвращалась к прежнему уровню.

Нейрофизиологическая диагностика в динамике проведена 10 пациентам с фармакорезистентной эпилепсией до лечения с использованием АМСК КМ и через 6–12 и более месяцев после. Выявлено улучшение показателей ЭЭГ у 6 пациентов из 10. При этом индекс пароксизмальности у этих пациентов в среднем составил до лечения 3,3 (в группе сравнения — 3,69), а после лечения снизился до 0,9, т.е. в 3,5 раза (в группе сравнения, напротив, возрос до 3,8). У 4 пациентов без выраженного клинического улучшения индекс пароксизмальности изменился незначительно: до лечения — 2,3; после лечения — 1,9.

Таким образом, индекс пароксизмальности за время наблюдения (12 и более месяцев) в основной группе выявляет устойчивое статистически достоверное снижение, оставаясь ниже начальных значений. В группе сравнения отмечалось статистически значимое нарастание индекса пароксизмальности выше исходных значений (Рис. 2).

Нарушение структуры максимальных значений средней когерентности в виде «эпилептического

треугольника» отмечалось у 7 пациентов из 10. Ещё у двух пациентов наблюдалось превышение предельно допустимых значений средней когерентности до 0,66, при крайне допустимом значении для здоровых людей — 0,63. То есть структура когерентных связей была нарушена в 9 случаях из 10. После лечения редукция патологической структуры когерентности в виде «эпилептического» треугольника произошла у 5 пациентов и нормализация предельно допустимых значений когерентности — у двух пациентов. В целом улучшение структуры средней когерентности имело место в 7 случаях из 9.

Патологическое фокусирование бета-активности отмечалось у одного пациента и после лечения структура бета-ритма в исследуемой группе не изменилась.

Пиковая частота основного ритма была ниже значений предельно допустимых для здоровых людей (9,15 Гц) у 4 пациентов и колебалась у них в пределах от 7,0 до 8,7 Гц, а у остальных пациентов — от 9,8 до 10,8 Гц. После лечения у двух пациентов с низкочастотным основным ритмом его частота повысилась с 8,7 до 10, у одного — с 7,0 до 7,3 Гц, а у одного снизилась с 8,7 до 6,5 Гц. У пациентов с альфа-ритмом средней частоты (от 9,8 до 10,8 Гц) существенных изменений этого показателя не отмечалось.

Патологическая инверсия альфа-ритма была выявлена у 8 пациентов из 10. После лечения в 2 слу-

чаях произошла нормализация частотно-пространственной структуры альфа-ритма.

Данные показатели указывают на выраженную тенденцию к восстановлению функционального состояния головного мозга и свидетельствуют об уменьшении активности эпилептического процесса на фоне лечения АМСК КМ. Положительный эффект применения АМСК КМ иллюстрирует и приведенный ниже клинический случай.

Пример: Пациентка Б., 1974 года рождения, F06.4, G40.2. Болеет с 1989 года. Заболевание ни с чем не связывает. Наследственность психопатологически не отягощена. Из перенесенных заболеваний — простудные. Аллергоанамнез не отягощен. Окончила 9 классов, СПТУ по специальности повар-кондитер. Работала продавцом, сейчас инвалид второй группы. Проживает с матерью и сыном. Приступы протекали с потерей сознания, тонико-клоническими судорогами, слюнотечением, иногда прикусом языка, частота 1–2 в месяц. Отмечались также сложные парциальные психомоторные приступы с частотой 3–4 в месяц.

На ЭЭГ до лечения отмечались выраженные нарушения с преобладанием крайне нерегулярного по форме, острого альфа-ритма с пиковой частотой 9,0 Гц. Количество разрядов эпилептиформной активности составляло 12 в минуту (Рис. 3).

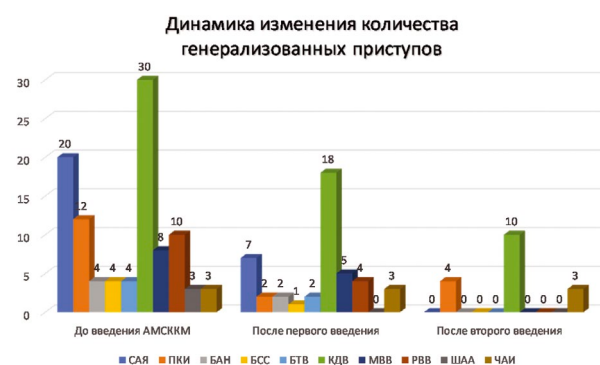


Рис. 1. Динамика изменения количества генерализованных судорожных приступов у пациентов, прошедших курсовое лечение АМСК КМ

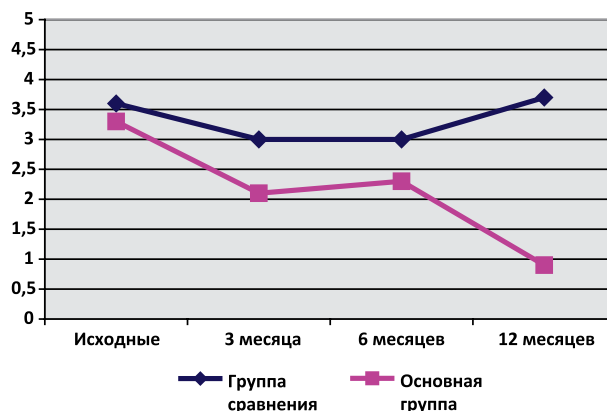


Рис. 2. Динамика среднего значения индекса пароксизмальности у пациентов исследуемых групп за период наблюдения



Рис. 3. ЭЭГ пациентки Б. Разряды эпилептиформной активности в левом полушарии.

Значения средней когерентности достигали 0,66 при крайне допустимом значении — 0,63 (Рис. 4).

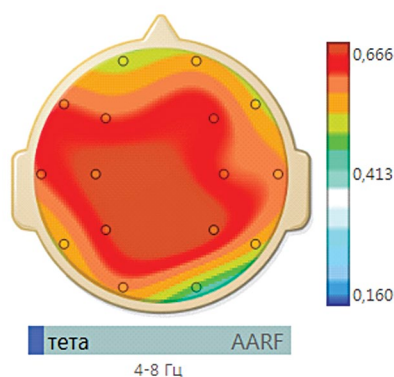


Рис. 4. Уровень средней когерентности повышен до 0,66.

Психологическое обследование при поступлении в стационар. Легкие (преддементные) когнитивные нарушения; выраженная лобная дисфункция; выраженная истощаемость психических процессов гиперимпульсивного типа, легкая инертность, ригидность; легкое ослабление мнестических процессов, темп запоминания замедленный, ригидный, отличается истощаемостью; умеренное ослабление аттентивных процессов; уровень абстрагирования достаточный, уровень обобщения низкий; выявлено тревожное личностное расстройство; субклинически выраженная тревога (низкий уровень ситуативной тревожности, высокий уровень личностной тревожности); субклинически выраженная депрессия.

МРТ головного мозга. Картина ликворной кисты левой височной доли с проявлениями выраженной нейродегенерации в затылочно-височном отделе слева.

Вирусологическое обследование, выполненное до начала лечения с использованием АМСК КМ, выявило положительную реакцию на вирус герпеса человека 6 и 7 типов. После проведения курсовой терапии АМСК КМ не детектировало ДНК вирусов герпеса человека 6 и 7 типов (табл. 1).

Через 6 месяцев при контрольном осмотре после первого курса лечения АМСК КМ у пациентки наблюдается положительная динамика в виде уменьшения количества приступов до 1-го генерализованного и 5 сложных парциальных в месяц. При визуальном анализе ЭЭГ существенных изменений не выявлено. Количество эпилептиформной активности не изменилось. Компьютерная обработка ЭЭГ показала увеличение уровня средней когерентности до 0,73, повышение пиковой частоты альфа-ритма с 9,0 до 9,25 Гц. Учитывая уменьшение частоты приступов после первого введения АМСК КМ, улучшения клинического состояния, неполную редукцию электроэнцефалографических показателей (эпилептиформная активность, индекс пароксизмальности, средняя локальная когерентность в виде эпилептического треугольника), решено провести повторный курс.

Таблица 1.

Детекция ДНК герпесвирусов у пациента до и после терапии АМСК

Вирус	Клинический материал	Результат (наличие ДНК)	
		До лечения	После лечения
ВГЧ-6	сыворотка крови	положительный	отрицательный
	лейкоциты	отрицательный	отрицательный
	ликвор	отрицательный	отрицательный
ВГЧ-7	сыворотка крови	отрицательный	отрицательный
	лейкоциты	положительный	отрицательный
	ликвор	отрицательный	отрицательный
ВЭБ	сыворотка крови	отрицательный	отрицательный
	лейкоциты	отрицательный	отрицательный
	ликвор	отрицательный	отрицательный
ЦМВ	сыворотка крови	отрицательный	отрицательный
	лейкоциты	отрицательный	отрицательный
	ликвор	отрицательный	отрицательный

После второго курса лечения АМСК КМ генерализованных судорожных приступов не отмечалось, количество сложных парциальных психомоторных приступов уменьшилось до двух раз в месяц. Общее снижение числа приступов с момента наблюдения составило 80%.

В состоянии биоэлектрической активности произошли существенные изменения. На ЭЭГ повысилась регулярность альфа-ритма. Регистрируются лишь редкие вспышки острых волн. Разрядов эпилептиформной активности не зарегистрировано (Рис. 5).

При повторном психологическом исследовании после 2-х курсов АМСК КМ выявлено, что на момент обследования нарушений когнитивных функций нет. Несколько нарушены мнестические процессы: незначительно снижены информационная нагруженность и удержание информации. Истощаемость внимания уменьшилась. Вербальная и психическая устойчивость в пределах нормы. При выполнении методики «Счет по Крепелину» выявлен высокий психомоторный темп. Коэффициент работоспособности в норме (=1.01). В эмоциональной сфере выявлена клинически выраженная тревога и депрессия, умеренная реактивная тревожность и высокая личностная тревожность. В характере личности наблюдаются выраженные типы акцентуации: экзальтированность, эмотивность, тревожность. В поведении может проявляться спонтанность, искренность, глубокая заинтересованность в другом человеке, некоторая ребячливость. Отличается ощущением беспокойства, внутренней напряженности, склонна ожидать неприятности. Для данного типа характерны постоянные сомнения в правильности своих поступков и мыслей, стремление сглаживать и избегать конфликтов лю-



Рис 5. ЭЭГ пациентки Б. после лечения.

бой ценой. Таким образом, определена существенная положительная динамика по данным психологической диагностики в динамике под влиянием лечения с применением АМСК КМ.

Пиковая частота альфа-ритма возросла до 9,75 Гц. Уровень средней когерентности снизился до 0,54 (Рис. 6).

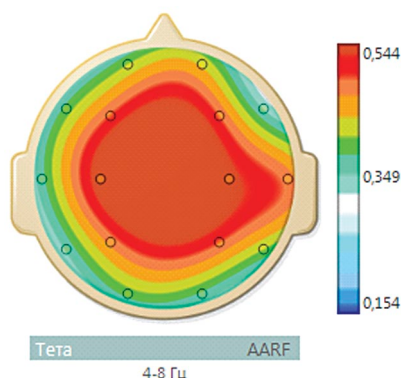


Рис. 6. Средняя когерентность после лечения снизилась до 0,54.

Нормализовалась частотно-пространственная структура альфа-ритма (Рис. 7).

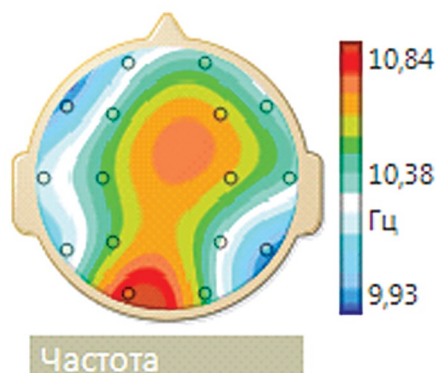


Рис. 7. Нормализация частотно-пространственной структуры альфа-ритма после лечения (альфа-ритм высокой частоты в затылочных отделах).

С наступлением стойкой клинической ремиссии улучшилось качество жизни пациентки, стабилизировались взаимоотношения в семье, уменьшилась раздражительность, повысился фон настроения и появились планы на будущее.

Обсуждение.

Новым и перспективным направлением медицины в настоящее время является регенеративная медицина, занимающаяся вопросами восстановления поврежденных или патологически измененных тканей и органов посредством трансплантации стволовых клеток, клеток предшественников и управления их дифференцировки.

Стало очевидным, что с помощью метода клеточной трансплантации появляется возможность возмещения отсутствующих клонов специализированных клеток в поврежденных органах, возможность увеличения пула функционирующих клеток, а также активизации в сохранившихся клетках поврежденного органа собственного резерва регенерации и пролиферации.

В настоящее время мезинхимальные стволовые клетки, выделяемые из костного мозга — одна из наиболее исследованных мультипотентных популяций взрослого организма, которая в силу своей относительной доступности к выделению, способности к пролиферации и дифференцировке при культивировании *in vitro* и при реимплантации, имеет высокую значимость в клинической практике.

Один из практических вопросов применения МСК связан с выбором места трансплантации клеточного материала. Предлагают трансплантировать клетки в венозную кровь, эндолумбально, непосредственно в место повреждения или в артерию, питающую данный орган. Однако, интраорганные трансплантации, как правило, сопряжены со сложным оперативным вмешательством, а введение клеточного материала в венозную кровь, спинномозговую жидкость представляет собой рутинную медицинскую процедуру.

К настоящему времени доказано, что МСК, введенные в венозную или артериальную кровь, эндолумбально мигрируют в область тканевого некроза из-за того, что при наличии воспалительных и некротических процессов в ткани повышается содержа-

ние SDF-1 (stromal cell derived factor). В то же время МСК — это клетки с высоким уровнем экспрессии CXCR4-рецептора к SDF-1, что, вероятно, и стимулирует их миграцию в очаг повреждения.

Основным механизмом потенциально полезного действия МСК при заболеваниях ЦНС, по-видимому, является их трофическая и иммуномодулирующая функция [8].

При изучении иммуномодулирующих свойств МСК было показано, что *in vitro* МСК снижают экспрессию лимфоцитами активационных маркеров CD25, CD38, CD69, уменьшают секрецию гамма-интерферона [8].

Кроме того, на поверхности МСК была обнаружена высокая степень экспрессии антигенов МНС I класса и отсутствие антигенов МНС класса II, которые обнаруживались внутриклеточно [8]. После добавления в культуру гамма-интерферона МНС II класса экспрессировались и на клеточной поверхности. Исследования *in vitro* показали также возможность трансдифференцировки МСК в нейрональные предшественники с последующей дифференцировкой их в клетки нервной ткани. На основе анализа экспрессии в индуцированных МСК маркеров, специфичных для нервной ткани, электрохимических свойств клеток и секреции нейротрансмиттеров многие исследователи делают вывод о способности МСК-производных нейроноподобных клеток выполнять функции клеток нервной системы. В то же время, согласно данным Р. Lu и соавт. (2005), нейрогенно индуцированные *in vitro* МСК поддерживают рост аксонов при нейротравме на уровне, сопоставимом с нативными МСК.

Известно о положительном терапевтическом применении стволовых клеток в лечении таких неврологических заболеваний, как рассеянный склероз, инсульт, болезни Паркинсона и Альцгеймера, хореи Гентингтона, мозжечковых атаксий [5]. Новым перспективным направлением в лечении пациентов с фармакорезистентной эпилепсией рассматривается вариант введения стволовых клеток костного мозга.

Заключение.

Полученные данные и приведенный клинический пример подтверждают безопасность, а также перспективность использования АМСК КМ для терапии пациентов с фармакорезистентной эпилепсией. При исследовании установлено, что при курсовой терапии АМСК КМ может быть достигнуто значительное улучшение у пациентов с первично- и вторичногенерализованными судорожными приступами, сложными парциальными психомоторными пароксизмами. Анализ данных ЭЭГ свидетельствует, что у 60% пациентов через 6–12 месяцев после комбинированного введения аутологичных МСК костного мозга выявлено значимое снижение индекса пароксизмальной активности (снижение индекса пароксизмальности у пациентов основной группы в среднем на 40%, в группе сравнения — на 30%) и снижение средней локальной когерентности (эпилептический треугольник). Отсутствие ВГЧ-6 и ВГЧ-7 после терапии АМСК КМ свидетельствует о возможной роли стволовых клеток в элиминации вируса. Возможно, этот эффект связан с иммуномодулирующей (похожей на иммунорегуляторную) способностью трансплантированных аутологичных стволовых клеток.

Литература

1. Вермель А. Е. Стволовые клетки: общая характеристика и перспективы применения в клинической практике. Клиническая медицина № 1, 2004; 5–11.
2. Докукина Т. В., Мисюк Н. Н. Визуальная и компьютерная ЭЭГ в клинической практике, Минск, 2018. — 203 с.
3. Квачева З. Б., Вотяков В. И., Титов Л. П. и др. Стволовые клетки. Перспективы их применения в медицине. Медицинский журнал № 4, 2005; 4–6.
4. Киссин, М. Я. Клиническая эпилептология. — М.: ГЭОТАР — Медиа, 2009. — 256с.
5. Климович В. Б. Иммуномодулирующая активность мезенхимальных стромальных (стволовых) клеток // Медицинская иммунология 2014, Т. 16, № 2, стр. 107–126.
6. Одинак М. М., Бисага Г. Н., А. В. Новицкий. Аутологичная трансплантация мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток при боковом амиотрофическом склерозе и рассеянном склерозе. // Вестн. Рос. Воен.-мед. акад. — 2009. — № 3. — С. 38–42.
7. Hlebokazov F., Dakukina T., et al., Treatment of refractory epilepsy patients with autologous mesenchymal stem cells reduces seizure frequency: An open label study: Advances in Medical Sciences, Volume 62, Issue 2, September 2017, P. 273–279.
8. Le Blanc, K. et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. Exp Hematol 2003; 31: 890–896
9. Shetty AK, Upadhy D. GABA-ergic cell therapy for epilepsy: Advances, limitations and challenges. Neurosci Biobehav Rev. 2016; 62:35–47.
10. 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.