

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 616.8-013.395-018.46-097:616.15532/.37

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-4-299-307>

Поступила в редакцию 09.03.2023

Received 09.03.2023

**А. С. Федулов<sup>1</sup>, М. М. Зафранская<sup>2</sup>, А. В. Борисов<sup>1</sup>, Д. Б. Нижегородова<sup>2</sup>,  
Н. А. Волкова<sup>1</sup>, С. И. Кривенко<sup>3</sup>, Т. А. Шалухо<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Республика Беларусь

<sup>3</sup>Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии,  
Минск, Республика Беларусь

## **ВЛИЯНИЕ ТЕРАПИИ, ИЗМЕНЯЮЩЕЙ КЛИНИЧЕСКОЕ ТЕЧЕНИЕ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЕРЕСАДКИ АЛЛОГЕННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, НА ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПАЦИЕНТОВ**

**Аннотация.** Рассеянный склероз (РС) – мультифакториальное аутоиммунное хроническое заболевание центральной нервной системы, проявляющееся многоочаговой неврологической симптоматикой и имеющее в типичных случаях на ранних стадиях ремиттирующее течение. РС является одной из важнейших проблем современной неврологии, что обусловлено значительной распространенностью заболевания, преобладанием в возрастной структуре пациентов от 20 до 40 лет, а также высокой инвалидизацией. Основной мишенью терапевтических опций при РС является воздействие на иммунную систему с целью подавления воспалительного процесса, который приводит к демиелинизации. При использовании препаратов, позволяющих модифицировать клиническое течение РС (бета-интерферон, глатирамера ацетат, финголимод и др.), у 40 % пациентов отмечается хороший эффект, у 40 % – сомнительный, у 20 % нет ответа на лечение. Отсутствие оптимальных протоколов лечения РС, направленных на селективное подавление аутореактивных клонов Т-лимфоцитов и восстановление поврежденных участков ЦНС, объясняет все возрастающий интерес исследователей к использованию иммуномодулирующих и нейропротекторных свойств мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Относительные преимущества аллогенной трансплантации МСК по сравнению с аутологичной широко обсуждаются, однако не приводятся объективные доказательства превосходства одного вида клеточной терапии над другим. В связи с этим вопрос об использовании аутологичных или аллогенных культур при лечении РС остается спорным.

Цель исследования – изучить влияние болезнь-модифицирующей терапии с применением аллогенных мезенхимальных стромальных стволовых клеток на иммунологические показатели пациентов с РС.

Оценена динамика ряда иммунологических биомаркеров 4 пациентов с рецидивно-ремиттирующим РС. Все пациенты мужчины. Медиана возраста –  $35,0 \pm 11,4$  года. На период скрининга балл по шкале Expanded Disability Status Scale (EDSS) – 3,6 [2,5; 6,0]. Одновременно исследовали иммунологические и клеточно-морфологические показатели культур МСК, подготовленных из жировой ткани (ЖТ) 7 доноров. Из 7 образцов МСК ЖТ было выбрано 2 образца с наиболее высокими коэффициентами супрессии пролиферации Т-лимфоцитов, для которых было подобрано для терапии 4 биомедицинских клеточных продукта.

У пациентов с РС через 6 мес. после трансплантации наблюдались наиболее значимые изменения – уменьшение продукции  $\gamma$ IFN, количества функционально незрелых «двойных позитивных» и «двойных негативных» Т-лимфоцитов и снижение цитотоксической направленности Т-лимфоцитов с  $\gamma\delta$ Т-клеточным рецептором, характеризующейся увеличением количества клеток, экспрессирующих CD45RO<sup>+</sup> (маркер клеток-памяти), в сочетании со снижением количества  $\gamma\delta$ TCR CD314<sup>+</sup> лимфоцитов (экспрессирующих ключевой активирующий киллерный рецептор).

Предварительные результаты исследования о влиянии пересадки аллоМСК на иммунологический статус пациентов с РС позволяют предположить, что введение этих клеток может использоваться в качестве нового метода патогенетической, болезнь-модифицирующей терапии при данной патологии.

**Ключевые слова:** аллогенные мезенхимальные стволовые клетки, болезнь-модифицирующая терапия, рассеянный склероз

**Для цитирования:** Влияние терапии, изменяющей клиническое течение рассеянного склероза с использованием пересадки аллогенных мезенхимальных стволовых клеток, на иммунологические показатели пациентов / А. С. Федулов [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2023. – Т. 20, № 4. – С. 299–307. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-4-299-307>

Alexander S. Fedulov<sup>1</sup>, Marina M. Zafranskaya<sup>2</sup>, Alexey V. Borisov<sup>1</sup>, Daria B. Nizhegorodova<sup>2</sup>,  
Natalia A. Volkova<sup>1</sup>, Svetlana I. Krivenko<sup>3</sup>, Tina A. Shalukho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

<sup>3</sup>Minsk Scientific and Practical Center of Surgery, Transplantation and Hematology, Minsk, Republic of Belarus

### IMPACT OF THE THERAPY THAT CHANGES THE CLINICAL COURSE OF MULTIPLE SCLEROSIS USING ALLOGENEIC MESENCHYMAL STEM CELL TRANSPLANTATION ON THE IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF PATIENTS

**Abstract.** Multiple sclerosis (MS) is a multifactorial, autoimmune, chronic disease of the nervous system, manifested by multifocal neurological symptoms and occurring in typical cases in the presence of symptoms of a relapsing course. MS is one of the problems of modern neurology, which is characterized by the prevalence of diseases, the prevalence of patients in the age group from 20 to 40 years, as well as high disability. The main target of therapeutic options in MS is the appearance on the immune system in order to suppress the inflammatory process leading to demyelination. With a set of drugs that allow clinically modifying the course of MS (beta-interferon, glatiramer acetate, fingolimod, etc.), 40 % of patients have a good effect, 40 % have a questionable result, and 20 % of patients with MS do not detect treatment. Lack of treatment protocols aimed at selective stimulatory suppression of autoreactive T-lymphocyte clones and restoration of affected areas of the CNS, weakening of the ever-increasing interest in identifying the immunomodulatory and neuroprotective properties of mesenchymal stem cells (MSCs). From carriers, the benefits of allogeneic versus autologous MSC implantation are widely discussed without the presence of objective evidence of the superiority of one type of cell therapy over the estimated and estimated fees of autologous or allogeneic transplants in obtaining MS remains controversial.

Objective – to study the effect of modifying therapy using allogeneic mesenchymal stromal stem cells on the immunological parameters of patients with multiple sclerosis.

The results of assessing the dynamics of a number of immunological biomarkers in 4 patients with relapsing-remitting MS. All patients are men. The median age is 35.0 + 11.4 years. At the screening period, the Expanded Disability Status Scale (EDSS) score was 3.6 [2.5; 6.0]. immunological and cellular-morphological parameters of MSC cultures were revealed, enhanced due to adipose tissue (AT) of 7 donors. Of the 7 samples of AT MSCs, 2 samples were selected with the highest coefficients of suppression of T-lymphocyte proliferation, of which 4 biomedical cell products should be taken for therapy.

In patients with MS, the most significant changes were observed by 6 months of the post-transplantation period and were characterized by a decrease in  $\gamma$ IFN production, the number of functions of immature “double positive” and “double negative” T-lymphocytes, and a decrease in the cytotoxic orientation of T-lymphocytes with a  $\gamma\delta$  T-cell receptor characterized by characteristics of an increase in the number of cells expressing CD45RO<sup>+</sup> (memory cell marker) in an increase with a decrease in the number of  $\gamma\delta$ TCR CD314<sup>+</sup> lymphocytes (expressive key activator of killer receptors).

Preliminary results from a study of transplantation of alloMSCs to the immunological status of MS patients suggest that they accept disease-modifying therapy in this application as pathogenetic, disease-modifying therapy.

**Keywords:** allogeneic mesenchymal stem cells, disease-modifying therapy, multiple sclerosis

**For citation:** Fedulov A. S., Zafranskaya M. M., Borisov A. V., Nizhegorodova D. B., Volkova N. A., Krivenko S. I., Shalukho T. A. Impact of the therapy that changes the clinical course of multiple sclerosis using allogeneic mesenchymal stem cell transplantation on the immunological parameters of patients. *Vestsi Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2023, vol. 20, no. 4, pp. 299–307 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-4-299-307>

**Введение.** Рассеянный склероз (РС) представляет собой аутоиммунное заболевание центральной нервной системы, характеризующееся нарушением баланса между регуляторными и потенциально миелин-реактивными клонами Т-лимфоцитов. В основе патогенеза заболевания лежат иммунологические процессы, связанные с нарушением регуляторной функции иммунной системы, активацией миелин-специфических клонов – CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, а также с изменением профиля минорных (малых) популяций лимфоцитов периферической крови.

Развитие такого перспективного направления, как клеточная иммунотерапия РС, основывается на использовании иммуномодулирующих и нейропротективных свойств мезенхимальных/стромальных стволовых клеток. Способность мезенхимальных стволовых клеток (МСК) оказывать регуляторное/супрессорное влияние на аутоиммунный процесс и стимулировать ремиелинизацию позволяет рассматривать введение МСК в качестве нового метода терапии РС, модифицирующего течение заболевания. Однако эффект от введения МСК может значительно варьироваться в зависимости как от характеристики самих МСК, так и от состояния иммунной системы реципиента. Результаты клинических исследований по применению аутологичной трансплантации МСК у пациентов с РС указывают на ее эффективность и безопасность [1–5].

Основным направлением клеточной терапии при РС является применение высокодозной полихимиотерапии с последующей трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ВХТ + аутоГСК) и мезенхимальных стромальных стволовых клеток (МССК). При этом при-

менение ВХТ + аутоГСК целесообразно для функциональной переустановки иммунной системы, а МСК – для использования иммуномодулирующих и нейротрофических свойств этих клеток.

Достаточное количество публикаций указывает на то, что по биологическим свойствам (дифференцировочный потенциал, экспрессия поверхностных антигенных маркеров и способность супрессировать Т-клеточный ответ) аутологичные и аллогенные культуры МСК пациентов с РС не отличаются от МСК здоровых доноров [6–8].

К преимуществам аллогенных МСК (аллоМСК) перед аутоМСК относят:

- 1) возможность использования аллоМСК у пациентов 3–4-й декады жизни, у которых снижается собственный общий пул стволовых клеток в различных компартментах организма;
- 2) отсутствие ограничений в заборе клеточного биоматериала, имеющих при трансплантации аутоМСК (использование глюкокортикостероидов и других иммунодепрессантов и др.);
- 3) применение у пациентов, у которых не удается получить достаточное для эффективной трансплантации количество аутоМСК из-за особенностей строения костного мозга;
- 4) наличие потенциальной возможности в достижении необходимой для иммуномодулирующего эффекта клеточности трансплантата и др.

Изложенное выше особенно актуально для пациентов с РС, которые, как правило, на протяжении длительного времени получают иммуносупрессивную/болезнь-модифицирующую терапию: купирование эксацербаций глюкокортикостероидами; лечение в период ремиссии препаратами, изменяющими течение РС.

Цель исследования – изучить влияние болезнь-модифицирующей терапии с применением аллогенных мезенхимальных стволовых клеток на иммунологические показатели пациентов с рассеянным склерозом.

**Материалы и методы исследования.** Дизайн: проспективное, открытое, одноцентровое исследование.

**Верификация диагноза и клинической формы заболевания.** Динамика ряда иммунологических биомаркеров до и после клеточной терапии оценена у 4 пациентов с рецидивно-ремиттирующим РС. Для верификации диагноза и клинической формы заболевания использовали критерии McDonald с соавт. (2018 г.) и MAGNIMS (2021 г.). Все пациенты мужчины. Медиана возраста –  $35,0 \pm 11,4$  года. На период скрининга балл по шкале Expanded Disability Status Scale (EDSS) – 3,6 [2,5; 6,0].

**Предтрансплантационная подготовка биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) – аллоМСК.** Культуры МСК приготавливали из жировой ткани (ЖТ) 7 доноров. После механического измельчения ЖТ смешивали с равным объемом 0,06%-ного раствора коллагеназы I типа и инкубировали в течение 1 ч. После нейтрализации фермента и двух циклов центрифугирования клетки высевали в культуральные флаконы. Морфологию клеток исследовали методом фазово-контрастного микроскопирования. Жизнеспособность клеток определяли с помощью общепринятого метода исключения трипанового синего. Для идентификации МСК использовали следующую панель моноклональных антител: CD45PC7, CD34 APC, CD 105 PE, CD90 FITC, CD13 PE, CD 9 FITC, CD 44 PE (Beckman Coulter, США). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto (Becton Dickinson, США). Для криоконсервирования клеток процедуру замораживания проводили на замораживателе Planer Biomed (Великобритания), используя программу для гемопоэтических стволовых клеток. Одновременно исследовали иммунологические показатели культур МСК, подготовленных из ЖТ 7 доноров. Из 7 образцов МСК ЖТ было выбрано 2 образца с наиболее высокими коэффициентами супрессии пролиферации Т-лимфоцитов, для которых было подобрано для терапии 4 БМКП (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Характеристика подобранных для терапии БМКП

Table 1. Characteristics of BMCs selected for therapy

Пациент	Коэффициент супрессии, %	Кол-во клеток, $\times 10^6$	Кол-во клеток/кг массы тела пациента
1	62,6	167,5	2,36
2	84,1	188,5	2,31
3	33,5	240	2,87
4	51,4	210	2,8

При подготовке БМКП стерильность клеточного продукта проверяли на автоматизированном анализаторе VasT/ALERT 3D (Франция) с использованием факультативно-анаэробных сред на основе стриптиказо-соевого бульона. В ходе исследования проводилось тестирование на анаэробную и аэробную флору, а также на грибковые инфекции.

**Выделение мононуклеаров периферической крови (МПК).** МПК выделяли из цельной венозной крови путем центрифугирования (1500 об/мин) в течение 30 мин при 4 °С на градиенте плотности Histopaque-1077. МПК культивировали в полной питательной среде RPMI-1640 (Invitrogen, Великобритания), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 2 ммоль L-глутамина, 1 % антибиотика-антимикотика. Все этапы получения и культивирования лимфоцитов проводили в стерильных условиях.

**Культуральный метод.** МПК пациентов с РС культивировали в концентрации  $2 \cdot 10^5$  клеток/лунку 96-луночного круглодонного планшета в полной культуральной среде, содержащей 2,5 мкг/мл фитогемагглютинина (ФГА) (Sigma, Германия) или 10 мкг/мл рекомбинантного миелин-олигодендроцитарного гликопротеина с аминокислотной последовательностью 1–125 (pMOG<sub>1-125</sub>) (РНПЦ ТиМБ, Беларусь), в течение 6 дней (при митогенной стимуляции) и 10 дней (при миелиновой стимуляции) при 37 °С в атмосфере с 5%-ным содержанием CO<sub>2</sub>. На 6-й день культивирования осуществляли замену половины культуральной среды с добавлением интерлейкина-2 (IL-2) (R&D Systems, США) в конечной концентрации 10 Ед/мл.

**Внутриклеточная продукция  $\gamma$ IFN методом проточной цитофлуориметрии.** ФГА- и миелин-индуцированную продукцию  $\gamma$ -интерферона ( $\gamma$ IFN) МПК оценивали через 3 дня ко-культивирования с БМКП аллоМСК. Для количественного определения уровня внутриклеточной продукции цитокинов за 4 ч до окончания культивирования добавляли 10 нг/мл форбол 12-миристанат 13-ацетата (Sigma, Германия), 1 мкг/мл кальциевой соли иономицина (Cayman Chemicals, США) и 10 мкг/мл брэфелдина А (Cayman Chemicals, США) с последующим окрашиванием МПК моноклональными антителами к поверхностным маркерам Т-лимфоцитов (CD3-FITC, Beckman Coulter, США) и дальнейшей фиксацией клеток в течение 10 мин 4%-ным раствором пара-формальдегида в физиологическом растворе. После отмывания клеток путем центрифугирования в течение 5 мин при 1500 об/мин к МПК добавляли моноклональные антитела  $\gamma$ IFN-PE (Beckman Coulter, США), разведенные в 2%-ном Triton X-100 (Sigma, Германия). Учет результатов проводили на проточном цитометре CytoFlex на 10 000 Т-лимфоцитов.

**Метод иммуноферментного анализа.** Концентрацию  $\gamma$ IFN определяли в 3-дневных супернатантах культур МПК пациентов с РС до пересадки аллоМСК, а также через 3 и 6 мес. после клеточной терапии методом твердофазного иммуноферментного анализа согласно инструкциям производителей с использованием коммерческого набора «ИФН-гамма-ИФА-БЕСТ» («Вектор-Бест», РФ). Результаты регистрировали на спектрофотометре Sunrise (Австрия) при  $\lambda = 450$  нм.

**Метод проточной цитофлуориметрии количественного анализа клеточного деления Т-лимфоцитов по включению CFSE.** Для оценки пролиферативного ответа МПК перед культивированием клетки в концентрации  $1 \cdot 10^7$  клеток/мл окрашивали флуоресцентным красителем карбоксифлуоресцеинсукцинилмидил эфиром (CFSE) (Sigma, Германия) в концентрации 7 мкМ в 1 мл культуральной среды RPMI-1640 в течение 5 мин в темноте при комнатной температуре. Реакцию окрашивания останавливали путем двукратного центрифугирования в холодной полной культуральной среде, содержащей RPMI-1640 с 25 ммоль HEPES, 2 ммоль L-глутамина, 1 % стрептомицина-пенициллина-неомицина (Sigma, Германия) и 10 % инактивированной ЭТС (Gibco, Германия).

Регистрацию количества пролиферирующих и непролиферирующих Т-лимфоцитов осуществляли методом проточной цитофлуориметрии с использованием МКAT CD3-PC7 (Beckman Coulter, США). Для регистрации результатов использовали проточный цитометр FC500 (Beckman Coulter, США) со средним объемом сбора 20 000 событий.

Для оценки пролиферативного ответа в соответствии с распределением флуоресценции устанавливали границы популяции CD3<sup>+</sup> Т-клеток среди живых лимфоцитов, в пределах которой выделяли процент непролиферирующих (CFSE<sup>high</sup>) и пролиферирующих (CFSE<sup>low</sup>) Т-клеток. Результат регистрировали при среднем объеме сбора 50 000 событий.

Для характеристики степени выраженности ингибирующего влияния клеточной терапии на пролиферацию Т-лимфоцитов использовали формулу расчета коэффициента супрессии пролиферативного ответа ( $k$ , %):

$$k = 100 - \frac{\Pi_{\Gamma\pi+\text{MCK}} \cdot 100}{\Pi_{\Gamma\pi}}$$

где  $\Pi_{\Gamma\pi+\text{MCK}}$  – относительное количество пролиферирующих Т-лимфоцитов в ко-культуре МПК и МСК или после клеточной терапии аллоМСК, стимулированной митогеном, %;  $\Pi_{\Gamma\pi}$  – относительное количество пролиферирующих Т-лимфоцитов в культуре МПК, стимулированной митогеном, % [6, 9, 10].

Для статистической обработки использовали стандартный пакет программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США), для описательной статистики – показатели медианы, нижнего (25-й) и верхнего (75-й) процентилей. Статистически значимые различия между сравниваемыми группами определяли непараметрическими методами, используя *U*-критерий Манна–Уитни для независимых переменных и критерий Уилкоксона для зависимых групп.

**Результаты и их обсуждение. Фенотипические показатели лимфоцитов периферической крови у пациентов с РС в динамике посттрансплантационного периода.** Фенотипические показатели в динамике посттрансплантационного периода определяли у пациентов, прошедших клеточную терапию аллоМСК ЖТ в концентрации  $187,0 (176,5–199,3) \cdot 10^6$  клеток ( $2,36 (2,34–2,53) \cdot 10^6/\text{кг}$ ), после *in vitro* определения оптимальных иммуномодулирующих свойств клеточных культур [10].

Относительное количество популяций/субпопуляций лимфоцитов периферической крови у пациентов с РС через 3 и 6 мес. после клеточной терапии представлено в табл. 2.

Т а б л и ц а 2. Количество популяций/субпопуляций лимфоцитов периферической крови у пациентов с РС в динамике посттрансплантационного периода (Me (25–75 %)), %

Table 2. Number of populations/subpopulations of peripheral blood lymphocytes in patients with MS in the dynamics of the post-transplant period (Me (25–75 %)), %

Фенотип лимфоцитов	До клеточной терапии (1)	После клеточной терапии		<i>p</i>
		через 3 мес. (2)	через 6 мес. (3)	
CD3 <sup>+</sup>	75,5 (71,6–79,1)	74,2 (73,1–81,7)	77,0 (71,4–79,7)	Статистически незначимо
CD3 <sup>+</sup> 314 <sup>+</sup>	45,0 (40,3–54,2)	44,9 (42,5–55,1)	55,1 (40,3–72,1)	Статистически незначимо
CD3 <sup>+</sup> 45RO <sup>+</sup>	62,0 (57,2–72,1)	62,1 (59,9–64,7)	67,0 (63,3–71,4)	Статистически незначимо
CD3 <sup>+</sup> 4 <sup>+</sup>	53,6 (36,1–56,9)	57,4 (33,2–57,7)	57,9 (36,4–63,1)	Статистически незначимо
CD3 <sup>+</sup> 8 <sup>+</sup>	39,2 (30,8–41,9)	34,1 (34,0–39,5)	34,7 (32,5–37,9)	Статистически незначимо
CD4 <sup>+</sup> 8 <sup>+</sup>	1,28 (0,74–2,08)	1,19 (0,67–1,46)	0,78 (0,27–1,04)	$p_{1,3} = 0,043$
CD4 <sup>+</sup> 8 <sup>-</sup>	7,32 (6,47–15,2)	6,9 (3,8–9,44)	7,0 (5,58–7,58)	Статистически незначимо
CD19 <sup>+</sup>	8,9 (8,0–14,0)	9,4 (8,4–13,8)	7,8 (3,4–12,3)	Статистически незначимо
CD56 <sup>+</sup>	11,9 (6,8–19,2)	8,9 (5,7–22,8)	11,5 (4,7–14,3)	Статистически незначимо
CD56 <sup>+</sup> 314 <sup>+</sup>	93,1 (91,9–95,7)	77,5 (73,7–97,0)	92,4 (72,9–96,8)	Статистически незначимо
CD3 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup>	1,7 (0,1–2,5)	1,1 (0,2–6,7)	2,7 (0,1–2,9)	Статистически незначимо
CD56 <sup>+</sup> 3 <sup>+</sup>	9,2 (1,0–11,4)	7,1 (3,4–15,4)	6,9 (3,5–14,2)	Статистически незначимо
γδТ-клетки	7,2 (5,9–15,9)	7,1 (5,0–11,7)	6,9 (4,8–10,1)	Статистически незначимо
γδTCR CD314 <sup>+</sup>	91,6 (90,9–96,7)	83,9 (75,6–88,9)	93,8 (91,4–94,7)	$p_{1,2} = 0,046$ $p_{2,3} = 0,068$
γδTCR CD45RO <sup>+</sup>	56,1 (33,9–76,8)	69,5 (44,1–83,3)	93,7 (89,2–94,2)	$p_{1,2} = 0,038$ $p_{1,3} = 0,021$

Наиболее значимые изменения наблюдались через 6 мес. после трансплантации и характеризовались изменением функционального статуса циркулирующих популяций лимфоцитов. Так, отмечалось снижение количества функционально незрелых «двойных позитивных» и «двойных негативных» Т-лимфоцитов. Кроме того, через 3 и 6 мес. после клеточной терапии установлено статистически значимое увеличение количества популяции Т-лимфоцитов с  $\gamma\delta$  Т-клеточным рецептором ( $\gamma\delta$ TCR), экспрессирующих CD45RO<sup>+</sup>, что отмечается при снижении цитотоксического потенциала данной минорной популяции клеток. Полученные результаты подтверждаются и снижением количества  $\gamma\delta$ TCR CD314<sup>+</sup> лимфоцитов (через 3 мес. после клеточной терапии). Известно, что NKG2D-медирированный сигнал (CD314 (natural killer group 2 member D, NKG2D)) усиливает цитотоксичность киллерных клеток и продукцию провоспалительных цитокинов и хемокинов, что предполагает определенную роль NKG2D-лиганд взаимодействия в модулировании иммунного ответа и его дисрегуляции при развитии аутоиммунных и воспалительных заболеваний [11].

**Продукция  $\gamma$ IFN МПК пациентов с РС в динамике посттрансплантационного периода.**

Для объективного анализа способности МПК пациентов с РС продуцировать  $\gamma$ IFN, являющегося основным цитокином Th1 в индукции воспалительного процесса, реализующего эффекторные механизмы клеточного иммунитета, проведена оценка как внеклеточной, так и внутриклеточной продукции изучаемого цитокина в динамике посттрансплантационного периода. В табл. 3 представлена концентрация  $\gamma$ IFN в супернатантах митоген/миелин-стимулированных МПК пациентов с РС после клеточной терапии БМПК аллоМСК. Через 6 мес. наблюдения отмечалось снижение концентрации  $\gamma$ IFN в супернатантах клеточных культур при *in vitro* стимулировании миелиновым антигеном рМОГ.

Т а б л и ц а 3. Концентрация  $\gamma$ IFN в супернатантах митоген/миелин-стимулированных МПК у пациентов с РС после клеточной терапии аллоМССК (Me (25–75 %)), пг/мл

Т a b l e 3. Concentration of  $\gamma$ IFN in supernatants of mitogen/myelin-stimulated PBMCs in patients with MS after cell therapy with alloMSSCs (Me (25–75 %)), pg/ml

Условия культивирования	До клеточной терапии (1)	После клеточной терапии		p
		через 3 мес. (2)	через 6 мес. (3)	
ФГА	1707,5 (1555,5–1736,0)	1640,0 (1170,1–1700,5)	1693,5 (1520,5–1763,0)	$p_{1-2} = 0,068$
рМОГ <sub>1-125</sub>	2,5 (1,6–4,35)	2,32 (2,14–4,47)	2,05 (1,34–1,98)	$p_{2-3} = 0,048$

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 4: ФГА – культивирование в присутствии 2,5 мкг/мл ФГА; рМОГ<sub>1-125</sub> – культивирование в присутствии 10 мкг/мл рекомбинантного миелин-олигодендрогликового гликопротеина.

Полученные результаты подтверждены данными по митоген/миелин-индуцированной внутриклеточной продукции  $\gamma$ IFN Т-лимфоцитами, определяемой методом проточной цитометрии (табл. 4).

Т а б л и ц а 4. Внутриклеточная митоген/миелин-стимулированная продукция  $\gamma$ IFN Т-лимфоцитами (количество CD3+ $\gamma$ IFN+ клеток) у пациентов с РС после клеточной терапии аллоМССК (Me (25–75 %)), %

Т a b l e 4. Intracellular mitogen/myelin-stimulated production of  $\gamma$ IFN by T lymphocytes (number of CD3+ $\gamma$ IFN+ cells) in patients with MS after cell therapy with alloMSCs (Me (25–75 %)), %

Условия культивирования	До клеточной терапии (1)	После клеточной терапии		p
		через 3 мес. (2)	через 6 мес. (3)	
ФГА	43,9 (15,14–73,9)	16,06 (7,03–40,04)	26,5 (10,04–49,04)	$p_{1-2} = 0,038$ $p_{1-3} = 0,043$
рМОГ <sub>1-125</sub>	7,83 (6,2–20,2)	7,03 (3,9–17,2)	5,1 (4,9–15,7)	$p_{1-3} = 0,048$

Количество интерферон-продуцирующих CD3<sup>+</sup>γIFN<sup>+</sup> клеток при миелиновой стимуляции у пациентов с РС через 6 мес. наблюдения также снижалось. Следует отметить и снижение количества CD3<sup>+</sup>γIFN<sup>+</sup> лимфоцитов при неспецифической стимуляции поликлональным митогеном через 3 мес. после трансплантации, что может оказывать влияние на противоинфекционную защиту со стороны иммунной системы.

**Митоген-индуцированная пролиферация Т-лимфоцитов пациентов с РС после клеточной терапии БМКП аллоМССК.** Для характеристики степени выраженности ингибирующего влияния клеточной терапии на пролиферацию Т-лимфоцитов у пациентов с РС проведен анализ *in vivo* коэффициентов супрессии пролиферативного ответа в сравнении с аналогичными показателями, предварительно полученными при *in vitro* исследовании (табл. 5).

Т а б л и ц а 5. Коэффициенты супрессии (*k*) митоген-индуцированного пролиферативного ответа Т-лимфоцитов у пациентов с РС после клеточной терапии аллоМССК (Ме (25–75 %)), %

Table 5. Suppression coefficients (*k*) of the mitogen-induced proliferative response of T-lymphocytes in patients with MS after cell therapy with alloMSSCs (Me (25–75 %)), %

Условия культивирования	До клеточной терапии ( <i>in vitro</i> исследования) (1)	После клеточной терапии ( <i>in vivo</i> исследования)		<i>p</i>
		через 3 мес. (2)	через 6 мес. (3)	
ФГА	61,3 (36,8–77,6)	3,68 (0,8–9,6)	6,13 (1,5–16,1)	$p_{1-2} = 0,025$ $p_{1-3} = 0,025$

Примечание. ФГА – культивирование в присутствии 2,5 мкг/мл ФГА.

Через 6 мес. после клеточной терапии не наблюдалось выраженного ингибирования неспецифической пролиферации Т-лимфоцитов, характеризующей общее функциональное состояние клеток, что выражалось в низком коэффициенте супрессии (*k*) митоген-индуцированной пролиферации Т-лимфоцитов. Анализируемый показатель не достигал аналогичной величины и при исследовании *in vitro* ( $k_{\text{ФГА 6 мес}} = 6,13 (1,5–16,1) \%$ ,  $k_{\text{ФГА in vitro}} = 61,3 (36,8–77,6) \%$ ,  $p = 0,068$ , критерий *W*).

Полученные данные подтверждают выводы ряда авторов о том, что МСК не снижают уровень противоинфекционного иммунитета и обладают пластичностью по отношению к иммунной системе, что зависит от их способности отвечать на агонисты TLRs (toll-like receptors) в микроокружении и модифицировать иммуносупрессивные свойства, не препятствуя развитию иммунного ответа на определенные возбудители [12].

**Заключение.** Проведена оценка фенотипического состава МПК, внутри- и внеклеточной миелин-индуцированной продукции γIFN и митоген-стимулированной пролиферации Т-лимфоцитов у пациентов с РС через 3 и 6 мес. после клеточной терапии БМКП аллоМССК. Через 6 мес. после трансплантации наблюдались наиболее значимые изменения – уменьшение продукции γIFN, количества функционально незрелых «двойных позитивных» и «двойных негативных» Т-лимфоцитов и снижение цитотоксической направленности Т-лимфоцитов с γδТ-клеточным рецептором, характеризующейся увеличением количества клеток, экспрессирующих CD45RO<sup>+</sup>, в сочетании со снижением количества γδTCR CD314<sup>+</sup> лимфоцитов. Выявленные изменения в количестве CD314-позитивных Т-лимфоцитов с γδ Т-клеточным рецептором у пациентов с РС после терапии аллоМССК предполагают определенную роль NKG2D-лиганд взаимодействия в модулировании иммунного ответа при развитии хронического воспалительного процесса.

У пациентов с РС в течение 6 мес. после клеточной терапии аллоМССК не происходит выраженного ингибирования функционального состояния Т-лимфоцитов на неспецифическую стимуляцию, что характеризует функциональную состоятельность клеток иммунной системы в отношении поддержания антигенного гомеостаза.

Таким образом, предварительные результаты изучения влияния клеточной терапии аллоМССК на иммунологический статус пациентов с РС позволяет предположить, что введение этих клеток может использоваться в качестве нового метода патогенетической, болезнь-модифицирующей терапии при данной патологии.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Благодарности.** Научное исследование проведено при поддержке гранта Президента Республики Беларусь.

**Acknowledgements.** The research was carried out with the support of a grant from the President of the Republic of Belarus.

### Список использованных источников

1. Клеточная терапия рассеянного склероза / А. С. Федулов [и др.]. – Минск : НиктаграфиксПлюс, 2018. – 242 с.
2. Сравнительная оценка эффективности однократного и курсового применения аутологичной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток в терапии рассеянного склероза / А. С. Федулов [и др.] // РМЖ. Мед. обозрение. – 2019. – Т. 3, № 4–2. – С. 54–58.
3. Gugliandolo, A. Mesenchymal Stem Cells in Multiple Sclerosis: Recent Evidence from Pre-Clinical to Clinical Studies / A. Gugliandolo, P. Bramanti, E. Mazzon // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21, N 22. – Art. 8662. <https://doi.org/10.3390/ijms21228662>
4. Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis / D. Karussis [et al.] // *Arch. Neurol.* – 2010. – Vol. 67, N 10. – P. 1187–1194. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2010.248>
5. Paving the way towards an effective treatment for multiple sclerosis: advances in cell therapy / M. J. Mansilla [et al.] // *Cell. Mol. Immunol.* – 2021. – Vol. 18, N 6. – P. 1353–1374. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00618-z>
6. Зафранская, М. М. Эффект мезенхимальных стволовых клеток при клеточной терапии рассеянного склероза / М. М. Зафранская, А. С. Федулов, Ю. Е. Демидчик. – Минск : Беларус. навука, 2016. – 213 с.
7. Darlington, P. J. Harnessing the therapeutic potential of mesenchymal stem cells in multiple sclerosis / P. J. Darlington, M. N. Boivin, A. Bar-Or // *Expert Rev. Neurother.* – 2011. – Vol. 11, N 9. – P. 1295–1303. <https://doi.org/10.1586/ern.11/113>
8. Characterization of *in vitro* expanded bone marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with multiple sclerosis / E. Mallam [et al.] // *Mult. Scler.* – 2010. – Vol. 16, N 8. – P. 909–918. <https://doi.org/10.1177/1352458510371959>
9. Иммунологический мониторинг пациентов с рассеянным склерозом после аутологичной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток / М. М. Зафранская [и др.] // *Иммунология.* – 2015. – Т. 36, № 5. – С. 284–289.
10. Метод клеточной терапии рассеянного склероза: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохран. Респ. Беларусь 27.12.2013 / А. С. Федулов [и др.]. – Минск, 2013. – 11 с.
11. Stojanovic, A. The NKG2D/NKG2DL Axis in the Crosstalk Between Lymphoid and Myeloid Cells in Health and Disease / A. Stojanovic, M. P. Correia, A. Cerwenka // *Front. Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – Art. 827. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00827>
12. Auletta, J. J. Emerging roles for multipotent, bone marrow-derived stromal cells in host defense / J. J. Auletta, R. Deans, A. Bartholomew // *Blood.* – 2012. – Vol. 119, N 8. – P. 1801–1809. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-384354>

### References

1. Fedulov A. S., Borisov A. V., Zafranskaya M. M., Marchenko L. N., Krivenko S. I., Kachan T. V., Dalidovich A. A. *Cell Therapy for Multiple Sclerosis*. Minsk, NiktagrafiksPlyus Publ., 2018. 242 p. (in Russian).
2. Fedulov A. S., Borisov A. V., Zafranskaya M. M., Krivenko S. I., Marchenko L. N., Kachan T. V., Moskovskikh Yu. V., Nizhegorodova D. B. Comparative evaluation of the efficiency of single and course use of autologous mesenchymal stem cell transplantation in the treatment of multiple sclerosis. *RMZh. Meditsinskoe obozrenie* [RMJ. Medical review], 2019, vol. 3, no. 4–2, pp. 54–58 (in Russian).
3. Gugliandolo A., Bramanti P., Mazzon E. Mesenchymal Stem Cells in Multiple Sclerosis: Recent Evidence from Pre-Clinical to Clinical Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, vol. 21, no. 22, art. 8662. <https://doi.org/10.3390/ijms21228662>
4. Karussis D., Karageorgiou C., Vaknin-Dembinsky A., Gowda-Kurkalli B., Gomori J. M., Kassis I. [et al.]. Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of Neurology*, 2010, vol. 67, no. 10, pp. 1187–1194. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2010.248>
5. Mansilla M. J., Presas-Rodríguez S., Teniente-Serra A., González-Larreategui I., Quirant-Sánchez B., Fondelli F. [et al.]. Paving the way towards an effective treatment for multiple sclerosis: advances in cell therapy. *Cellular & Molecular Immunology*, 2021, vol. 18, no. 6, pp. 1353–1374. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00618-z>
6. Zafranskaya M. M., Fedulov A. S., Demidchik Yu. E. *The effect of mesenchymal stem cells in cell therapy of multiple sclerosis*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2016. 213 p. (in Russian).
7. Darlington P. J., Boivin M. N., Bar-Or A. Harnessing the therapeutic potential of mesenchymal stem cells in multiple sclerosis. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 2011, vol. 11, no. 9, pp. 1295–1303. <https://doi.org/10.1586/ern.11/113>
8. Mallam E., Kemp K., Wilkins A., Rice C., Scolding N. Characterization of *in vitro* expanded bone marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 2010, vol. 16, no. 8, pp. 909–918. <https://doi.org/10.1177/1352458510371959>
9. Zafranskaya M. M., Nizhegorodova D. B., Yurkevich M. Yu., Borisov A. V., Krivenko S. I., Ivanchik G. I., Kulinich S. S., Fedulov A. S. Immunological monitoring of patients with multiple sclerosis after autologous mesenchymal stem cell transplantation. *Immunologiya* [Immunology], 2015, vol. 36, no. 5, pp. 284–289 (in Russian).
10. Fedulov A. S., Zafranskaya M. M., Motuzova Ya. M., Nizhegorodova D. B., Krivenko S. I., Borisov A. V. [et al.]. *Method of cell therapy for multiple sclerosis: instructions for use: approved by the Ministry of Health of the Republic of Belarus on December 27, 2013*. Minsk, 2013. 11 p. (in Russian).

11. Stojanovic A., Correia M. P., Cerwenka A. The NKG2D/NKG2DL Axis in the Crosstalk Between Lymphoid and Myeloid Cells in Health and Disease. *Frontiers in Immunology*, 2018, vol. 9, art. 827. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00827>

12. Auletta J. J., Deans R. J., Bartholomew A. M. Emerging roles for multipotent, bone marrow-derived stromal cells in host defense. *Blood*, 2012, vol. 119, no. 8, pp. 1801–1809. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-384354>

### Информация об авторах

*Федулов Александр Сергеевич* – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: fedulov@tut.by

*Зафранская Марина Михайловна* – д-р мед. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: zafranskaya@gmail.com

*Борисов Алексей Викторович* – д-р мед. наук, профессор. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: al.borisov1974@gmail.com

*Нижегородова Дарья Борисовна* – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nzh@tut.by

*Волкова Наталья Анатольевна* – ассистент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Volk2079@tut.by

*Кривенко Светлана Ивановна* – д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник, заместитель директора. Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии (ул. Семашко, 8, 220045, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: svtl\_kr@tut.by

*Шалухо Тина Александровна* – ассистент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: tinashalukho@mail.ru

### Information about the authors

*Alexander S. Fedulov* – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: fedulov@tut.by

*Marina M. Zafranskaya* – D. Sc. (Med.), Associate Professor, Leading Researcher. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zafranskaya@gmail.com

*Alexey V. Borisov* – D. Sc. (Med.), Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: al.borisov1974@gmail.com

*Daria B. Nizhegorodova* – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nzh@tut.by

*Natalia A. Volkova* – Assistant. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Volk2079@tut.by

*Svetlana I. Krivenko* – D. Sc. (Med.), Professor, Chief Researcher, Deputy Director. Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology (8, Semashko Str., 220045, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: svtl\_kr@tut.by

*Tina A. Shalukho* – Assistant. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tinashalukho@mail.ru